

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004 年 12 月 23 日 (23.12.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/111230 A1

(51) 国際特許分類: C12N 15/09, 1/21, C12P 17/18 //
(C12N 1/21, C12R 1:465) (C12P 17/18, C12R 1:465)

(74) 代理人: 小林 和憲 (KOBAYASHI, Kazunori); 〒170-0004 東京都豊島区北大塚 2 丁目 2 番 1 号 太陽生命大塚ビル 3 階 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/007407

(22) 国際出願日: 2003 年 6 月 11 日 (11.06.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 社団法人北里研究所 (THE KITASATO INSTITUTE) [JP/JP]; 〒108-8642 東京都港区白金五丁目 9 番 1 号 Tokyo (JP).

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 大村 智 (OMURA, Satoshi) [JP/JP]; 〒157-0076 東京都世田谷区岡本三丁目 3 番 1 2 号 Tokyo (JP). 池田 治生 (IKEDA, Haruo) [JP/JP]; 〒210-0900 神奈川県川崎市幸区新塚越 1-2 サウザンドシティ 5-1103 Kanagawa (JP). 小笠原 由美子 (OGASAWARA, Yumiko) [JP/JP]; 〒213-0033 神奈川県川崎市高津区下作延 1 8 7 7 番地 ヒルズ M 1 0 2 Kanagawa (JP).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: STRAIN BELONGING TO THE GENUS STREPTOMYCES AND BEING CAPABLE OF PRODUCING NEMADICTIN AND PROCESS FOR PRODUCING NEMADICTIN USING THE STRAIN

(54) 発明の名称: ストレプトマイセス属に属するネマデクテン生産能を有する菌株、該菌株を用いるネマデクテンの製造法

(57) Abstract: To obtain nemadictin as C-13 hydroxynemadictin to which a saccharide can add, a strain capable of producing C-13 hydroxynemadictin is constructed by modifying nemadictin aglycon biosynthesis genes. Further, a C-13 glycosynemadictin-producing strain is constructed by transferring aveBI-BVIII genes participating in the glycosylation of Avermectin and the biosynthesis of oleandrose. Thus, C-13 hydroxynemadectin and nemadictin glycosylated at the C-13 position can be efficiently obtained with the use of the producing strains constructed molecular genetic techniques and it is expected that the biological activities thereof can be thus improved.

(57) 要約: 本発明は、ネマデクテンを、糖が付加し得る C-13 ヒドロキシルネマデクテンとして得るためにネマデクテンアグリコン合成遺伝子群の改変を行い、C-13 ヒドロキシルネマデクテンを生産する生産株を作製する。更にまた、エバメクチンの配糖化およびオレアンドロス合成に関与する aveBI-BVIII 遺伝子群を導入して、C-13 グリコシルネマデクテン生産株を作製する。このように、分子遺伝学的手法によって作製した生産株により C-13 ヒドロキシルネマデクテン及び C-13 位が配糖化されたネマデクテンを効率的に取得することができ、その生物活性の改善が期待できる。

WO 2004/111230 A1

明細書

ストレプトマイセス属に属するネマデクチン生産能を有する菌株、
 該菌株を用いるネマデクチンの製造法

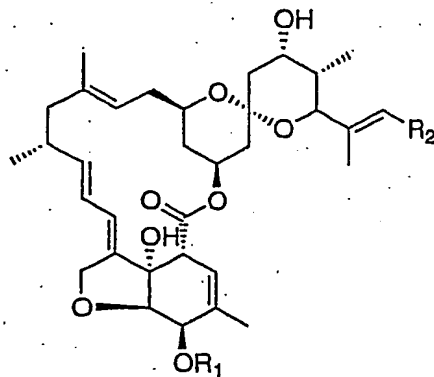
背景技術

産業上の利用分野

本発明はストレプトマイセス属に属するネマデクチン生産能を有する菌株、
 該菌株を用いるネマデクチンの製造法に関し、更に詳しくはネマデクチン生産能
 を有するストレプトマイセス属に属する微生物を用いるC-13ヒドロキシルネ
 マデクチン及びC-13グリコシルネマデクチンの製造法及びストレプトマイセ
 ス・シアネオグリセウス・サブスピーシーズ・ノンシアノゲナスに属する菌株に
 関する。

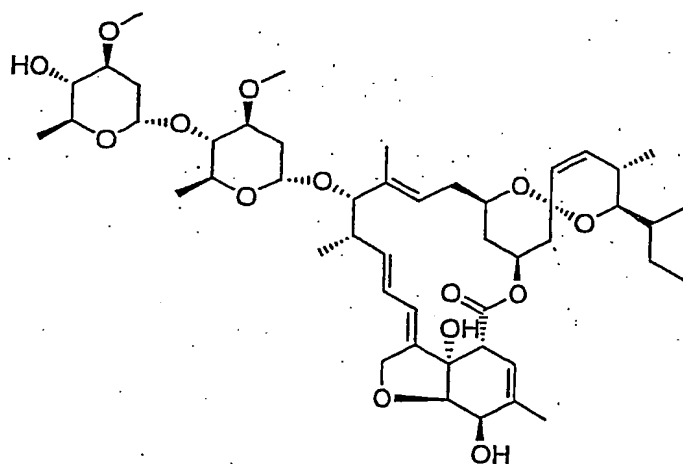
従来技術

ベンゾフラン環骨格を有する一連の化合物は優れた抗寄生虫・抗昆虫活性を
 有し、エバーメクチンやミルベマイシンが実用化されている。ストレプトマイセ
 ス・シアネオグリセウス・サブスピーシーズ・ノンシアノゲナスが生産するベン
 ゾフラン環骨格を有するネマデクチンは α 、 β 、 γ および δ の4種の成分が存在
 し、そのC-13位には下記の構造で表されるように置換基が存在せず飽和して
 いる。



ネマデクチン α	$R_1 = H$	$R_2 = CH(CH_3)_2$
β	$R_1 = H$	$R_2 = CH_3$
γ	$R_1 = CH_3$	$R_2 = CH_3$
δ	$R_1 = CH_3$	$R_2 = CH(CH_3)_2$

ネマデクチンのC-13位が飽和する理由はネマデクチンアグリコン部分の生成に参与するネマデクチンポリケチド合成酵素（ネマデクチンPKS）のモジュール7がKS-AT-DH-ER-KR-ACPという構成をしている為めである。飽和したC-13位について化学合成的に立体選択的修飾をもたらすことは構造上困難であり、下記構造のエバーメクチンのように糖付加による抗昆虫・抗寄生虫活性の上昇への期待がもてるにもかかわらず、化学合成による誘導体の製造はなされていなかった。



上記のように、化学合成ではネマデクチンのC-13位に立体選択的に水酸基を導入することやその水酸基を配糖化することは困難とされていた構造を、本発明者らは、鋭意研究の結果、分子遺伝学的手法によってC-13グリコシルネマデクチン生産菌を作製することにより立体選択的に配糖化されたネマデクチンを効率的に取得することに成功した。

本発明はこのような知見に基いて完成されたものであり、その目的は分子遺伝学的手法によってC-13グリコシルネマデクチン生産菌を作製し、立体選択的に配糖化されたネマデクチンを効率的に取得することができ、その生物活性の改善を期待し得る、ストレプトマイセス属に属するネマデクチン生産能を有する

菌株を提供するものである。

本発明の他の目的は、ネマデクチンを生産するストレプトマイセス属に属する微生物に、ネマデクチン類似化合物を生産する微生物のDNAを導入してC-13ヒドロキシルネマデクチン及びC-13グリコシルネマデクチンを生産蓄積させ採取するネマデクチンの製造法を提供するものである。

発明の開示

本発明者らは、ネマデクチンを化学合成的に修飾可能な、特に糖が付加するC-13ヒドロキシルネマデクチンとして得るためにネマデクチンアグリコン生合成遺伝子群の改変を行い、ネマデクチンPKSとエバーメクチンポリケチド合成酵素（エバーメクチンPKS）とのハイブリッドポリケチド合成酵素（ハイブリッドPKS）を形成することによりC-13ヒドロキシルネマデクチンを生産する菌株を作製した。そして、エバーメクチンPKSの転写調節に関与するaveR遺伝子を導入してエバーメクチンPKS遺伝子の転写を促進させるとともにC-13ヒドロキシルネマデクチンの生産性を向上させた。

なお、本菌株は、ストレプトマイセス・シアネオグリセウス・サブスピーシーズ・ノンシアノゲナス (*Streptomyces cyaneogriseus* subsp. *noncyanogenus*) $\Delta nemA4::vph$ $\Delta attB_{761}::aveA4-aveA3-aveE$ $\Delta attB_{\phi_{c31}}::aveR$ として、特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブタペスト条約に基づき日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6（郵便番号305-8566）[AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566 Japan] の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (International Patent Organism Depositary National Institute of Advanced Industrial Science and Technology) に寄託した。受託日は平成15年6月6日であり、受託番号はFERM BP-8395である。

さらにまた、エバーメクチンの配糖化及びオレアンドロース生合成に関与するaveB I-BVIII 遺伝子群を導入した菌株を作製し、C-13グリコシルネマデクチン生産株を作製した。

なお、本菌株は、ストレプトマイセス・シアネオグリセウス・サブスピーシーズ・ノンシアノゲナス (*Streptomyces cyaneogriseus* subsp. *noncyanogenus*) $\Delta nemA4::vphattB_{Tc1}::aveA4-aveA3-aveEattB_{\phi_{c31}}::aveRattB_{R4}::aveB1-BVIII$ として、特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブタペスト条約に基づき日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6 (郵便番号305-8566) [AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566 Japan] の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (International Patent Organism Depositary National Institute of Advanced Industrial Science and Technology) に寄託した。受託日は平成15年6月6日であり、受託番号はFERM BP-8394である。

本発明はストレプトマイセス・シアネオグリセウス・サブスピーシーズ・ノンシアノゲナスに属する菌株を培地で培養し、培養物中にC-13グリコシルネマデクチンを生産蓄積させ、該培養物よりC-13グリコシルネマデクチンを採取するC-13グリコシルネマデクチンの製造法である。また、本発明は、ストレプトマイセス・シアネオグリセウス・サブスピーシーズ・ノンシアノゲナスに属し、C-13ヒドロキシルネマデクチン及びC-13グリコシルネマデクチン生産能を有する菌株である。

以上のごとく、ネマデクチンを生産するストレプトマイセス属に属する微生物に、ネマデクチン類似化合物を生産する微生物のDNAを導入してC-13ヒドロキシルネマデクチン及びC-13グリコシルネマデクチンを生産蓄積せしめたという報告は未だ知られていない。

従って、本発明はストレプトマイセス・シアネオグリセウス・サブスピーシ

ーズ・ノンシアノゲナスに属し、C-13位配糖化ネマデクチン生産能を有する菌株を提供するものである。

更に本発明はストレプトマイセス・シアネオグリセウス・サブスピーシーズ・ノンシアノゲナスに属し、C-13位水酸化ネマデクチン生産能を有する菌株を提供するものである。

更に本発明はストレプトマイセス・シアネオグリセウス・サブスピーシーズ・ノンシアノゲナスに属し、C-13位水酸化ネマデクチン生産能を有する微生物を培地で培養し、培養物中にC-13位水酸化ネマデクチンを生産蓄積させ、該培養物よりC-13位水酸化ネマデクチンを採取するC-13位水酸化ネマデクチンの製造法を提供するものである。

更に本発明はストレプトマイセス・シアネオグリセウス・サブスピーシーズ・ノンシアノゲナスに属し、C-13位配糖化ネマデクチン生産能を有する微生物を培地で培養し、培養物中にC-13位配糖化ネマデクチンを生産蓄積させ、該培養物よりC-13位配糖化ネマデクチンを採取するC-13位配糖化ネマデクチンの製造法を提供するものである。

更に本発明はストレプトマイセス・シアネオグリセウス・サブスピーシーズ・ノンシアノゲナスに属し、ストレプトマイセス・アベルミチリスのエバーメクチンアグリコン生合成遺伝子群を保有するC-13位水酸化ネマデクチン生産能を有する微生物及びその製造法を提供するものである。

更に本発明はストレプトマイセス・シアネオグリセウス・サブスピーシーズ・ノンシアノゲナスに属し、ストレプトマイセス・アベルミチリスのエバーメクチンアグリコン生合成遺伝子群を保有するC-13位配糖化ネマデクチン生産能を有する微生物及びその製造法を提供するものである。

更に本発明はストレプトマイセス・シアネオグリセウス・サブスピーシーズ・ノンシアノゲナスに属し、ネマデクチンアグリコン生合成遺伝子群nemA3-4オペロンのKS10をコードする領域にバイオマイシン耐性遺伝子を挿入したネマデクチン非生産性の菌株(KS10挿入変位株)を提供するものである。

更に本発明はストレプトマイセス・シアネオグリセウス・サブスピーシーズ・ノンシアノゲナスに属し、上記KS10挿入変位株にストレプトマイセス・ア

ベルミチリスのエバーメクチンアグリコン生合成遺伝子群 *aveA* 3-4 を保有し、*NemA* 1-2 及び *AVES* 3-4 とのハイブリッドPKSを形成しうる微生物を提供するものである。

更に本発明はストレプトマイセス・シアネオグリセウス・サブスピーシーズ・ノンシアノゲナスに属し、*NemA* 1-2 及び *AVES* 3-4 とのハイブリッドPKSを形成しうる微生物でストレプトマイセス・アベルミチリスのエバーメクチン生合成遺伝子群の制御遺伝子 *aveR* を保有する菌株を提供するものである。

更に本発明はストレプトマイセス・シアネオグリセウス・サブスピーシーズ・ノンシアノゲナスに属し、*NemA* 1-2 及び *AVES* 3-4 とのハイブリッドPKSを形成しうる微生物でストレプトマイセス・アベルミチリスのエバーメクチン生合成遺伝子群の制御遺伝子 *aveR* 及びエバーメクチン配糖化およびオレアンドロース生合成遺伝子群 *aveBI* - *BVIII* を保有する菌株を提供するものである。

図面の簡単な説明

第1図はネマデクチンPKSモジュール10のKS領域を含む3.0kb断片の制限酵素地図であり、矢印は転写方向を示す。

第2図はネマデクチンKS10領域のSalI部位vph挿入断片の制限酵素地図であり、矢印は転写方向を示す。

第3図はC-13ヒドロキシルネマデクチンの¹H-NMRスペクトルである。

第4図はC-13ヒドロキシルネマデクチンの¹³C-NMRスペクトルである。

第5図はC-13グリコシルネマデクチンの¹H-NMRスペクトルである。

第6図はC-13グリコシルネマデクチンの¹³C-NMRスペクトルである。

発明を実施するための最良の形態

以下に本発明の実施例について具体的に説明するが、本発明は決してこれ

のみに限定されるものではない。

実施例 1

ネマデクチンPKS、KS10領域にバイオマイシン耐性遺伝子 (*viomycin phosphotransferase; vph*) を挿入したストレプトマイセス・シアネオグリセウス・サブスピーシーズ・ノンシアノゲナス (*Streptomyces cyaneogriseus sp. noncyanogenus*) NRRL 15773の取得

(1) ネマデクチンPKS、KS10をコードするDNA断片のサブクローニング

ネマデクチンアグリコン合成酵素遺伝子を含むコスミドDNAのうち、モジュール10のKSドメイン (NEM-KS10) をコードするDNAを含むコスミドDNAを制限酵素BamHI (宝酒造社製、日本国) で消化した後、アガロースゲル電気泳動し、KS10領域を含有する3.0 kbのDNA断片をジーンクリーンIIキット (バイオ101社製、米国) を用いて分離・精製した。また、プラスミドpUC19 (宝酒造社製、日本国) は、BamHIで消化した後、alkaline phosphatase (Calf intestine) (宝酒造社製、日本国) で脱リン酸化した。NEM-KS10を含む3.0 kb断片とpUC19のBamHI消化物、各々約0.1 μ gをLigation High (東洋紡社製、日本国) を用いて、16°Cで16時間反応することで連結させた。

このDNA連結反応物10 μ lと大腸菌DH5 α のコンピテントセル (日本ジーン社製、日本国) を接触させることにより、形質転換を行った。形質転換株の選択には、50 μ g/mlのアンプシリン (和光純薬社製、日本国) を含有した20 mlのLB寒天培地を用い、0.1 mol/Lイソプロピルー β -D-チオガラクトピラノシド (IPTG) 水溶液、2% 5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリルー β -D-ガラクトシド (X-gal、ナカライテスク社製、日本国) のジメチルホルムアミド (ナカライテスク社製、日本国) 溶液を、あらかじめ各々50 μ l塗布しておいた。組換えプラスミドを保持する形質転換株のコロニ

ーは、 β -ガラクトシダーゼ活性を失っているため、X-galを分解できず、白色を呈する。この白コロニーをエーゼで拾い、1.0 mlのLB培地に植菌し、37°Cで16時間、振盪培養後、アルカリ法にて菌体からプラスミドを抽出・精製した。得られた組換えプラスミドの一部を制限酵素BamHIで消化し、3.0 kbのDNA断片がpUC19に挿入されているプラスミドpUC19::NEM-KS10が得られていることを確認した。

(2) ストレプトマイセス・シアネオグリセウス・サブスピーシーズ・ノンシアノゲナス (*Streptomyces cyaneogriseus* sp. noncyanogenus) NRRL 15773由来BamHI 3.0 kb DNA断片の末端配列の決定

はじめにサイクルシーケンス反応の鋳型DNAの調製を行なった。実施例1-(1)で得た組換えプラスミドpUC19::NEM-KS10に、ExpandTaqDNAポリメラーゼ緩衝液(Roch社製、米国)、dATP、dGTP、dCTP、dTTP、配列番号1に記載の5'-GTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGG-3'の塩基配列を有する合成DNA、配列番号2に記載の5'-TCCGGCTCGTATGTTGTGTGGA-3'の塩基配列を有する合成DNAをプライマーセットとして添加し、ExpandTaqDNAポリメラーゼ(Roch社製、米国)を加えた後、96°Cで5分間処理した後、96°Cで30秒間、70°Cで3分間の反応を1サイクルとして30サイクル繰り返した。反応終了後、エキソヌクレアーゼI(アマシャムファルマシアバイオテック社製、米国)及びアルカリフォスファターゼ(アマシャムファルマシアバイオテック社製、米国)を加え、37°Cで15分間反応させた後、80°Cで10分間処理して両酵素を失活させた。両酵素を失活させた後、これを鋳型DNAとしてIR標識プライマー(アロカ社製、日本国)及びThermo sequenase Fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP(アマシャムファルマシアバイオテック社製、米国)を添加し、サイクルシーケンス反応を行った。反応終了後、反応停止液を加え、混合し試料溶液とした。

この試料溶液を90℃、2分間加熱し、氷冷した後、シーケンス電気泳動を行った。電気泳動装置はDNAシーケンサーModel 4000シリーズ(LI-COR社製、米国)を使用し、電気泳動後のイメージの解析はBase Image IR Software Version 2.30のImage Analysis Version 2.10で行った。得られた各DNA断片の塩基配列をもとに、そのアミノ酸配列についてBLAST検索を行った結果、一端は*S. avermitilis* aveA4と相同性の高い配列、反対側の末端には*S. avermitilis*のreductaseと相同性の高い配列が見いだされた。これらの塩基配列から、BamHI断片のネマデクチンPKS遺伝子の転写方向を確認した(第1図参照)。

(3) NEM-KS10領域へのバイオマイシン耐性遺伝子(viomycin phosphotransferase; vph)の挿入

pUC19::NEM-KS10を制限酵素BamHIで消化した後、アガロースゲル電気泳動し、KS10領域を含有する3.0kbのDNA断片を分離・精製した。また、pBluescript SK+ (東洋紡社製、日本国)をBamHIで消化して得た約3.0kbのDNA断片0.1μgとNEM-KS10を含むBamHI断片0.1μgを混合し、Ligation High (東洋紡社製、日本国)を用いて、16℃で16時間反応することで連結させた。このDNA連結反応物10μlと大腸菌DH5αのコンピテントセルを接触させることにより形質転換を行い、pBluescript SK+にNEM-KS10断片を連結した組換えプラスミドpBluescript SK+::NEM-KS10を得た。さらに、pBluescript SK+::NEM-KS10を制限酵素HindIII (宝酒造社製、日本国)及びSstI (GIBCO BRL社製、米国)で消化し、アガロースゲル電気泳動して得た約3.0kbのNEM-KS10を含有するDNA断片と、プラスミドpUC19をHindIII 及びSstIで制限酵素消化した約2.7kbのDNA断片を各々0.1μgずつ混合し、Ligation Highを用いて、16℃で16時間反応することで連結させた。このDNA連結反応物10μlを用いて大腸菌DH5α

の形質転換を行い、pUC19-Bgl (pUC19のマルチクローニングサイトの両端EcoRIとHindIIIの外側にBglII切断配列AGATCTを挿入させたもの)にNEM-KS10断片を連結した組換えプラスミドpUC19-Bgl::NEM-KS10を得た。

vphはプラスミドpUC19::vphを制限酵素EcoRI (宝酒造社製、日本国) 及びPstI (宝酒造社製、日本国) で消化した後、アガロースゲル電気泳動し、vphを含む1.7kbのDNA断片を分離・精製することによって得た。このvphを含む1.7kbのEcoRI/PstI DNA断片はBKL kit (宝酒造社製、日本国) を用いて37℃で15分間反応することでDNA末端の平滑化を行った。pUC19-Bgl::NEM-KS10を制限酵素SalI (宝酒造社製：日本国) で消化した後、BKL kitを用いてSalI切断部位の平滑末端化を行った。平滑末端化した断片と上記の平滑末端化したvph 1.7kbのDNA断片と混合し、Ligation Highを用いてDNAの連結を行なった。このDNA連結反応物10 μ lを用いて大腸菌DH5 α を形質転換し、KS10領域内にvphを挿入した組換えプラスミドpUC19-Bgl::NEM-KS10-vphを得た (第2図参照)。なお、形質転換体の選択には50 μ g/mlのアンピシリン及び150 μ g/mlのツベラクチノマイシンN含有のLB培地を用いた。

pUC19-Bgl::NEM-KS10-vphを制限酵素BglII (宝酒造社製、日本国) で消化した後、アガロースゲル電気泳動し、KS10-vph領域を含有する4.7kbのDNA断片を分離・精製した。放線菌用ベクタープラスミドpGM160を制限酵素BamHIで消化した後、アガロースゲル電気泳動し、6.8kbのDNA断片を分離・精製した。さらに、alkaline phosphatase (Calf intestine) を用いてDNA 5'末端の脱リン酸化を行った。このpGM160 BamHI消化物とNEM-KS10-vph領域を含有する4.7kbのDNA断片を各々0.1 μ gずつ混合し、Ligation Highを用いてDNAの連結を行った。このDNA連結反応物10 μ lを用いて大腸菌DH5 α を形質転換し、組換えプラスミドpGM160::NEM-KS10-vphを得た。なお、形質転換体の選択

には50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のアンピシリン及び150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のツベラクチノマイシンN含有のLB培地を用いた。pGM160::NEM-KS10-vphを用いて大腸菌GM2929 hsdS::Tn10の形質転換を行った。なお、形質転換体の選択には30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のクロラムフェニコール（和光純薬社製、日本国）、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のアンピシリン及び150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のツベラクチノマイシンN含有のLB培地を用いた。大腸菌GM2929 hsdS::Tn10の形質転換体から非メチル化プラスミドDNA pGM160::NEM-KS10-vphを調製した。

(4) ストレプトマイセス・シアネオグリセウス・サブスピーシーズ・ノンシアノゲナス (*Streptomyces cyaneogriseus* sp. noncyanogenus) NRRL 15773からのプロトプラストの調製
凍結(-30°C)保存してあるストレプトマイセス・シアネオグリセウス・サブスピーシーズ・ノンシアノゲナスの孢子懸濁液を50 mlの30%w/vシヨ糖、0.5%w/vグリシン、5mM MgCl_2 を含むYEME培地(500 ml容三角フラスコ)に移植し、ロータリーシェーカーで30°C、48時間培養した。菌体を3000 rpm、10分間遠心して集め、20 mlのP10培地を加えてよく懸濁した後、3000 rpm、10分間遠心して菌体を洗浄した。洗浄した菌体に1 mg/mlの卵白リゾチーム含有のP10培地を加えて懸濁し、30°Cで30分間保温してプロトプラストを生じさせた。10 mlのP10培地を加えてよく混合した後、プロトプラスト懸濁液を綿栓フィルターに通しリゾチームで未消化の菌糸を除去した。綿栓フィルターを通過したプロトプラスト懸濁液を3000 rpm、10分間遠心し、プロトプラストを沈澱させた。上清を除き10 mlのP10培地でよく懸濁した後、3000 rpm、10分間遠心しプロトプラストを沈澱させた。再度P10培地を10 ml加え、プロトプラストを懸濁、遠心してプロトプラストを洗浄した。得られた洗浄プロトプラストを5 mlのP10培地に懸濁し、0.1 mlずつ滅菌したエッペンドルフチューブに分注した後、-80°Cで保存した。

(5) 染色体上のネマデクチンPKS、KS10領域にバイオマイシン耐性遺伝子(viomycin phosphotransferase; vph)を挿入した遺伝子交換体の作成

実施例1-(3)で得た組換えプラスミドpGM160::NEM-KS10-vph約1 μ gと実施例1-(4)で得たストレプトマイセス・シアネオグリセウス・サブスピーシーズ・ノンシアノゲナスのおよそ 5×10^8 個のプロトプラストを滅菌したエッペンドルフチューブに入れ、直ちに5.00 μ lの25%ポリエチレングリコールMW1000溶液(2.5%ショ糖、0.05%KH₂PO₄、0.1M CaCl₂、50mM Tris-マレイン酸、pH8.0)を加えて混合し、室温で1分間放置した。次に、450 μ lのP10培地を加えてよく混合した後、その100 μ lずつをR2YE寒天培地上にのせ、2.5mlの軟寒天培地とともに塗り広げた。30℃で20時間培養した後、200 μ g/mlのチオストレプトン(シグマ社製、米国)含有の軟寒天培地2.5mlを重ねた。30℃で5日間培養し、チオストレプトンに耐性な形質転換体を得た。

R2YE寒天培地表面に生育したチオストレプトンに耐性の形質転換体を無菌的にかきとり、ホモジナイザーで菌糸を切断し、YMS寒天培地に塗り広げた。37℃で4日間培養し、胞子が着生したものをマスタープレートとしてツベラクチノマイシンN含有YMS寒天培地にレプリカした。30℃で2日間培養し、ツベラクチノマイシンに耐性のコロニーを選択し、それぞれをYMS寒天培地上に塗布した。これを30℃で5日間培養して胞子が着生したものをマスタープレートとし、20 μ g/mlチオストレプトン含有YMS寒天培地にレプリカして30℃で2日間培養した。ツベラクチノマイシンに耐性、チオストレプトンに感受性となった株を選択し、染色体上のネマデクチンPKS、KS10領域にvphが挿入したことをSouthern hybridization法で確認するとともにネマデクチンを生産しないことを確認した。得られたそれぞれの菌株はストレプトマイセス・シアネオグリセウス・サブスピーシーズ・ノンシアノゲナス Δ nemA4::vph株(*Streptomyces cyaneogriseus* subsp. *noncyanogenus* Δ nemA4::vp

h) とした。

なお、本菌株は、ストレプトマイセス・シアネオグリセウス・サブスピーシーズ・ノンシアノゲナス (*Streptomyces cyanogriseus* subsp. *noncyanogenus*) $\Delta n e m A 4::v p h$ として、特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブタペスト条約に基づき日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6 (郵便番号305-8566) [AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566 Japan] の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (International Patent Organism Depositary National Institute of Advanced Industrial Science and Technology) に寄託した。受託日は平成15年6月6日であり、受託番号はFERM BP-8393である。

(6) ストレプトマイセス・エバーミチリス (*Streptomyces avermitilis*) 由来エバーメクチンアグリコン合成酵素遺伝子 *aveA3-4* の取得

ストレプトマイセス・エバーミチリスの染色体DNAを制限酵素 *EcoRI* で消化し、低融点アガロースゲル電気泳動した後、*aveA3-4* 全体を含有する配列番号3に記載の39912bpのDNA断片をゲルごと切り出し、フェノール抽出、フェノールクロロホルム抽出、アルコール沈澱することにより分離・精製した。また、染色体組込み型ベクタープラスミド *pTG1int-cos* を制限酵素 *EcoRI* で消化した後、アガロースゲル電気泳動し、5.2kbのDNA断片を分離・精製した。この *EcoRI* 消化した *pTG1int-cos* を *alkaline phosphatase* (Calf intestine) を用いてDNA 5' 末端の脱リン酸化を行った後、約0.5 μg を *aveA3-4* 全体を含有する39912bpのDNA断片約2 μg と混合し、*Ligation kit ver. 2* (宝酒造社製、日本国) のI液およびII液を用いて、25°Cで10分間反応することで連結させた。

このDNA連結反応物をアルコール沈澱後、DNAを2 μ lのTE緩衝液に溶解した。これをReady To Go Lambda Packaging Kit（アマシャムファルマシアバイオテック社製、米国）のPackaging Extractに加え、さらに23 μ lの滅菌水を加え室温で2時間放置した後、0.5mlのファージ希釈緩衝液（SM緩衝液）および30 μ lのクロロホルムを加え、転倒混和した。次いで、13200rpmで30秒間遠心し、上清を新たな滅菌エッペンドルフチューブに移し、ラムダファージパッケージング溶液を得た。

（7）エバーメクチンアグリコン合成酵素遺伝子aveA3-4を保有する大腸菌BL21 recA欠損株の取得

実施例1-（6）で得たラムダファージパッケージング溶液を用いて大腸菌BL21 recA欠損株を宿主としてトランスダクションを行った。宿主大腸菌BL21 recA欠損株をLB培地を用いて、37℃、一晩振盪培養したものを0.4%麦芽糖添加LB培地に1%となるように加え、37℃、3時間振盪培養した。遠心分離により菌体を回収し、10mM硫酸マグネシウム溶液を用いて洗浄した。さらに遠心分離により菌体を回収し、適量の10mM硫酸マグネシウム溶液に懸濁して宿主菌液を得た。この宿主菌液と実施例1-（6）で得たラムダファージパッケージング溶液をエッペンドルフチューブ内で1：1の割合で混合し、室温で30分間静置した。その後、LB培地を加え、30℃で1.5時間振盪したものをカナマイシン（50 μ g/ml）含有LA培地上に塗布し、30℃で一晩培養した。カナマイシン耐性のコロニーを96穴テストプレートにライブラリーとして培養し、その中から配列番号4に記載の合成DNAとハイブリダイズするコスミドDNAを保有するクローンを選択した。エバーメクチンアグリコン合成酵素遺伝子aveA3-4を保有する組換えプラスミドDNAは、カナマイシン（50 μ g/ml）含有LB培地を用いて一晩培養した菌体から常法にしたがってアルカリ法で精製した。

実施例2

ネマデクチンPKSモジュール10 v p h挿入変位株へのエバーメクチン生合成遺伝子群 *aveA3-4* の導入

実施例1-(5)で得たネマデクチンPKSモジュール10領域v p h挿入株の孢子懸濁液を50 mlの30% w/v ショ糖、0.5% w/v グリシン、5 mM $MgCl_2$ を含むYEME培地(500 ml容三角フラスコ)に移植し、ロータリーシェーカーで30°C、48時間培養した。菌体を3000 rpm、10分間遠心して集め、20 mlのP10培地を加えよく懸濁した後、3000 rpm、10分間遠心して菌体を洗浄した。洗浄した菌体に1 mg/mlの卵白リゾチーム含有のP10培地を加えて懸濁し、30°Cで30分間保温してプロトプラストを生じさせた。10 mlのP10培地を加えてよく混合した後、プロトプラスト懸濁液を綿栓フィルターに通しリゾチームで未消化の菌糸を除去した。綿栓フィルターを通過したプロトプラスト懸濁液を3000 rpm、10分間遠心し、プロトプラストを沈澱させた。上清を除き10 mlのP10培地でよく懸濁した後、3000 rpm、10分間遠心しプロトプラストを沈澱させた。再度P10培地を10 ml加え、プロトプラストを懸濁、遠心してプロトプラストを洗浄した。得られた洗浄プロトプラストを5 mlのP10培地に懸濁し、0.1 mlずつ滅菌したエッペンドルフチューブに分注した後、-80°Cで保存した。

このプロトプラストに実施例1-(7)で作製したpTG1 int-cos :: *aveA3-4* 約1 μ gを加え、直ちに500 μ lの25%ポリエチレングリコールMW1000溶液(2.5% ショ糖、0.05% KH_2PO_4 、0.1 M $CaCl_2$ 、50 mM Tris-マレイン酸、pH8.0)を加えて混合し、室温で1分間放置した。次に、450 μ lのP10培地を加えてよく混合した後、その100 μ lずつをR2YE寒天培地上にのせ、2.5 mlの軟寒天培地とともに塗り広げた。30°Cで20時間培養した後、100 μ g/mlのネオマイシン(シグマ社製、米国)含有の軟寒天培地2.5 mlを重ねた。30°Cで5日間培養し、ネオマイシンに耐性な形質転換体を得た。R2YE寒天培地表面に生育したネオマイシンに耐性の形質転換体を無菌的に2 μ g/mlネオマイシン含有YMS寒天培地に塗り広げた。得られたそれぞれの菌株はストレプトマイセス・シアネオグリセウス・サブスピーシーズ・ノンシアノゲナス Δ *nemA*

4 : : v p h a t t B_{reg1} : : a v e A 4 - a v e A 3 - a v e E 株とした。

実施例 3

ストレプトマイセス・シアネオグリセウス・サブスピーシーズ・ノンシアノゲナス $\Delta n e m A 4 : : v p h a t t B_{reg1} : : a v e A 4 - a v e A 3 - a v e E$ 株への *a v e R* の導入

配列番号 5 に記載のエバーメクチン生合成遺伝子群の転写制御遺伝子 *a v e R* を含む制限酵素 *A g e I* DNA断片を連結したベクタープラスミド *p U C B M 2 1 : : a v e R* を制限酵素 *X b a I* および *H i n d I I I* で消化し、アガロースゲル電気泳動し、*a v e R* を含有する 3. 2 7 k b の DNA断片を分離・精製した。染色体組込み型ベクタープラスミド *p U C 1 9 a a d 3" - i n t \Phi C 3 1* の *X b a I* および *H i n d I I I* 認識部位に *a v e R* 含有 3. 2 7 k b *X b a I - H i n d I I I* 断片を連結し、大腸菌 *B L 2 1 \Delta r e c A* を形質転換した。

実施例 2 で得たストレプトマイセス・シアネオグリセウス・サブスピーシーズ・ノンシアノゲナス $\Delta n e m A 4 : : v p h a t t B_{reg1} : : a v e A 4 - a v e A 3 - a v e E$ 株の孢子懸濁液を 5 0 m l の 3 0 % w / v ショ糖、0. 5 % w / v グリシン、5 m M *M g C l₂* を含む Y E M E 培地 (5 0 0 m l 容三角フラスコ) に移植し、ロータリシェーカーで 3 0 ° C 、 4 8 時間培養した。菌体を 3 0 0 0 r p m 、 1 0 分間遠心して集め、2 0 m l の P 1 0 培地を加えてよく懸濁した後、3 0 0 0 r p m 、 1 0 分間遠心して菌体を洗浄した。洗浄した菌体に 1 m g / m l の卵白リゾチーム含有の P 1 0 培地を加えて懸濁し、3 0 ° C で 3 0 分間保温してプロトプラストを生じさせた。1 0 m l の P 1 0 培地を加えてよく混合した後、プロトプラスト懸濁液を綿栓フィルターに通しリゾチームで未消化の菌糸を除去した。綿栓フィルターを通過したプロトプラスト懸濁液を 3 0 0 0 r p m 、 1 0 分間遠心し、プロトプラストを沈澱させた。上清を除き 1 0 m l の P 1 0 培地でよく懸濁した後、3 0 0 0 r p m 、 1 0 分間遠心しプロトプラストを沈澱させた。再度 P 1 0 培地を 1 0 m l 加え、プロトプラストを懸濁、遠心してプロトプラストを洗浄した。得られた洗浄プロトプラストを 5 m l の P 1 0 培地に懸濁し、0. 1 m l ずつ滅菌したエッペンドルフチューブに分注した後、- 8

0℃で保存した。このプロトプラストに上記で得たプラスミドDNA pUC19aad3"-intΦC31::aveR約1μgを加え、直ちに500μlの25%ポリエチレングリコールMW1000溶液(2.5%ショ糖、0.05%KH₂PO₄、0.1M CaCl₂、50mM Tris-マレイン酸、pH8.0)を加えて混合し、室温で1分間放置した。

次に、450μlのP10培地を加えてよく混合した後、その100μlずつをR2YE寒天培地上にのせ、2.5mlの軟寒天培地とともに塗り広げた。30℃で20時間培養した後、スペクチノマイシン3mg/ml含有軟寒天培地2.5mlを重ねた。30℃で5日間培養しスペクチノマイシンに耐性な形質転換体を得た。R2YE寒天培地表面に生育したスペクチノマイシンに耐性の形質転換体を無菌的に300μg/mlスペクチノマイシン含有YMS寒天培地に塗り広げた。得られたそれぞれの菌株はストレプトマイセス・シアネオグリセウス・サブスピーシーズ・ノンシアノゲナスΔnemA4::vph attB_{TC1}::aveA4-aveA3-aveE attB_{φc31}::aveR株とした。

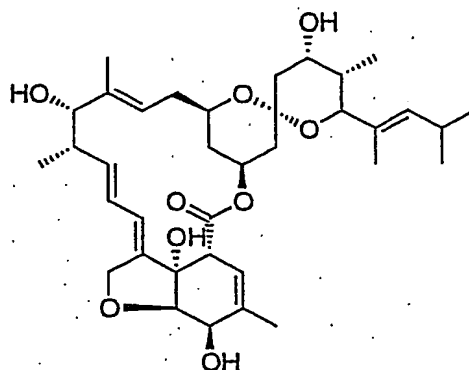
実施例4

ストレプトマイセス・シアネオグリセウス・サブスピーシーズ・ノンシアノゲナスΔnemA4::vph attB_{TC1}::aveA4-aveA3-aveE attB_{φc31}::aveR株の培養および生産物の分離・精製

実施例3で得た染色体上ネマデクチンPKSモジュール7vph挿入株にaveA3-4およびaveRを組み込んだ株をネマデクチン種培地に植菌し、30℃で3日間振盪培養したもの1mlを500ml容三角コルベンに分注したネマデクチン生産培地50mlに加えた。これを28℃で5日間、180rpmで振盪培養した後、3000rpmで10分間遠心し、菌体を回収した。得られた菌体をアセトンで懸濁し、室温で1時間攪拌した後、菌体とアセトン層を分取し、アセトン層について溶媒留去した。溶媒乾固した物質に水およびクロロホルムを加え攪拌した後、クロロホルム層を分取し、無水硫酸ナトリウムを加え脱水処理を行った。クロロホルム層の溶媒留去を行い、得られた残留物を粗抽出物とし

た。粗抽出物をごく少量のクロロホルムに溶解し、クロロホルムで平衡化したシリカゲル（シグマ社製、米国）カラムに通塔し、クロロホルムで洗浄した後、25% v/v 酢酸エチル/クロロホルムで洗浄し、C-13 ヒドロキシルネマデクチンを含まない画分を除去した。次いで、4.0% v/v 酢酸エチル/クロロホルムで溶出される画分を除去し、50% v/v 酢酸エチル/クロロホルムでC-13 ヒドロキシルネマデクチンを多く含む画分を集めた後、得られた溶出液を減圧乾固して黄色油状の物質を得た。次いで、得られた黄色油状の物質は以下の条件でHPLCを用いて分離・精製した。

Pegasil ODSカラム（ODS $3\mu\text{m}$ 、カラムサイズ $20\phi\text{mm} \times 250\text{mm}$ ；センシュウ科学社製、日本国）を用い、アセトニトリル50%、メタノール18%、水32%の混合溶媒を移動相、検出246nm、流速8mL/minで分離した時、保持時間28分の成分を単離した。得られた化合物は、 ^1H -NMRスペクトル（第3図参照）データ、及び ^{13}C -NMRスペクトル（第4図参照）データおよびマスペクトルデータ（ $M+1=629$ ）によってその構造を解析し、下記式で表されるC-13 ヒドロキシルネマデクチン α （分子式： $\text{C}_{36}\text{H}_{52}\text{O}_9$ ）であることを確認した。



実施例 5

ストレプトマイセス・エバーミチリス (*Streptomyces averm*
itilis) 由来エバーメクチン配糖化遺伝子群aveBI-BVIIIの取得
配列番号6記載の11041bpのDNA断片、すなわちaveBI-BV
III全体を含有するDNAを連結したpUC19::aveBI-BVIIIを制

制限酵素 *Xba*I および *Hind*III で消化し、*ave*B I-B VIII 全体を含有する DNA 断片を低融点アガロースゲル電気泳動した後、フェノール抽出、フェノールクロロホルム抽出、アルコール沈澱することにより分離・精製した。また、染色体組込み型ベクタープラスミド *pUC19intR4-ts r* を制限酵素 *Xba*I-*Hind*III で消化した後、アガロースゲル電気泳動し、11 kb の DNA 断片を分離・精製した。これらの DNA 断片を *Ligation High* を用いて連結し、この DNA 連結反応物 10 μ l を用いて大腸菌 BL21 Δ *recA* を形質転換し、組換えプラスミド *pUC19intR4-ts r::ave* B I-B VIII を得た。なお、形質転換体の選択には 50 μ g/ml のアンピシリン含有の LB 培地を用いた。

実施例 6

ストレプトマイセス・シアネオグリセウス・サブスピーシーズ・ノンシアノゲナス Δ *nemA4::vph attB_{intR61}::aveA4-aveA3-aveE attB ϕ _{c31}::aveR* 株へのストレプトマイセス・エバーミチリス (*Streptomyces avermitilis*) 由来エバーメクチン配糖化及びオレアンドロース生合成遺伝子群 *ave* B I-B VIII の導入

実施例 3 で得たストレプトマイセス・シアネオグリセウス・サブスピーシーズ・ノンシアノゲナス Δ *nemA4::vph attB_{intR61}::aveA4-aveA3-aveE attB ϕ _{c31}::aveR* 株の胞子懸濁液を 50 ml の 30% w/v ショ糖、0.5% w/v グリシン、5 mM $MgCl_2$ を含む YEME 培地 (500 ml 容三角フラスコ) に移植し、ロータリシェーカーで 30°C、48 時間培養した。菌体を 3000 rpm、10 分間遠心して集め、20 ml の P10 培地を加えよく懸濁した後、3000 rpm、10 分間遠心して菌体を洗浄した。洗浄した菌体に 1 mg/ml の卵白リゾチーム含有の P10 培地を加えて懸濁し、30°C で 30 分間保温してプロトプラストを生じさせた。10 ml の P10 培地を加えてよく混合した後、プロトプラスト懸濁液を綿栓フィルターに通しリゾチームで未消化の菌糸を除去した。綿栓フィルターを通過したプロトプラスト懸濁液を 3000 rpm、10 分間遠心し、プロトプラストを沈澱さ

せた。上清を除き10mlのP10培地でよく懸濁した後、3000rpm、10分間遠心しプロトプラストを沈澱させた。再度P10培地を10ml加え、プロトプラストを懸濁、遠心してプロトプラストを洗浄した。得られた洗浄プロトプラストを5mlのP10培地に懸濁し、0.1mlずつ滅菌したエッペンドルフチューブに分注した後、-80℃で保存した。このプロトプラストに実施例5で得たプラスミドDNA pUC19intR4-tsrr::aveBI-BV III 約1μgを加え、直ちに500μlの25%ポリエチレングリコールMW1000溶液(2.5%シヨ糖、0.05%KH₂PO₄、0.1M CaCl₂、50mM Tris-マレイン酸、pH8.0)を加えて混合し、室温で1分間放置した。

次に、450μlのP10培地を加えてよく混合した後、その100μlずつをR2YE寒天培地上にのせ、2.5mlの軟寒天培地とともに塗り広げた。30℃で20時間培養した後、チオストレプトン200μg/ml含有軟寒天培地2.5mlを重ねた。30℃で5日間培養しチオストレプトンに耐性な形質転換体を得た。R2YE寒天培地表面に生育したチオストレプトンに耐性の形質転換体を無菌的に20μg/mlチオストレプトン含有YMS寒天培地に塗り広げた。得られたそれぞれの菌株はストレプトマイセス・シアネオグリセウス・サブスピーシーズ・ノンシアノゲナスΔnemA4::vph attB_{TC1}::aveA4-aveA3-aveE attB_{φc31}::aveR attB_{R4}::aveBI-BVIIIとした。

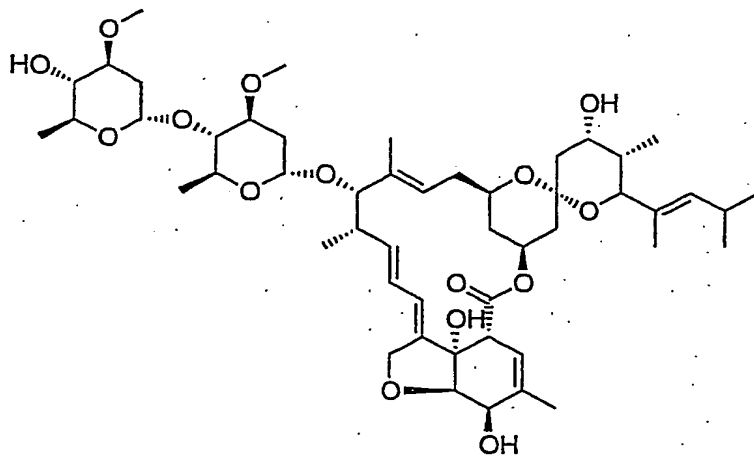
実施例7

ストレプトマイセス・シアネオグリセウス・サブスピーシーズ・ノンシアノゲナスΔnemA4::vph attB_{TC1}::aveA4-aveA3-aveE attB_{φc31}::aveR attB_{R4}::aveBI-BVIII 株の培養および生産物の分離・精製

実施例6で得た染色体上ネマデクチンPKSモジュール10のvph挿入株にaveA3-4, aveRおよびaveBI-BVIIIを組み込んだ株をネマデクチン種培地に植菌し、30℃で3日間振盪培養したもの1mLを500mL

容三角コルベンに分注したネマデクチン生産培地 5.0 mL に加えた。これを 28 °C で 5 日間、180 rpm で振盪培養した後、3000 rpm で 10 分間遠心し、菌体を回収した。得られた菌体をアセトンで懸濁し、室温で 1 時間攪拌した後、菌体とアセトン層を分取し、アセトン層について溶媒留去した。溶媒乾固した物質に水およびクロロホルムを加え攪拌した後、クロロホルム層を分取し、無水硫酸ナトリウムを加え脱水処理を行った。クロロホルム層の溶媒留去を行い、得られた残留物を粗抽出物とした。粗抽出物をごく少量のクロロホルムに溶解し、クロロホルムで平衡化したシリカゲル（シグマ社製、米国）カラムに通塔し、クロロホルムで洗浄した後、30% v/v 酢酸エチル/クロロホルムで洗浄し、C-13 グリコシルネマデクチンを含まない画分を除去した。次いで、40% v/v 酢酸エチル/クロロホルムで溶出される画分、50% v/v 酢酸エチル/クロロホルムで溶出される画分を集めた後、得られた溶出液をそれぞれ減圧乾固して黄色油状の物質を得た。次いで、得られた黄色油状の物質を HPLC を用いて分離・精製した。

カラムは P e g a s i l ODS (3 μ m、カラムサイズ 20 ϕ × 250 mm ; センシュー科学社製) を使用し、アセトニトリル・メタノール・水を 55 : 18 : 27 の割合で混合したものを移動層として用いた。流速は 6 mL/min に設定し、246 nm の吸収を指標に、保持時間 120 分の成分を分取した。得られた化合物は ^1H -NMR スペクトル (第 5 図参照) データ、及び ^{13}C -NMR スペクトル (第 6 図参照) データ、マスペクトルデータ ($M+1=917$) によってその構造を解析し、下記式 C-13 グリコシルネマデクチン α (分子式 : $\text{C}_{50}\text{H}_{76}\text{O}_{15}$) であることを確認した。



前記の各実施例において使用した各種培地および緩衝液の組成は以下に示す通りである。

ファージ希釈緩衝液 (SM緩衝液)

Tris 塩酸 (pH 7.5)	10 mM
塩化ナトリウム	100 mM
硫酸マグネシウム 7 水和物	10 mM

サイクルシーケンス反応停止液

プロモフェノールブルー	0.02 %
EDTA (pH 8.0)	20 mM
ホルムアミド	95 %

YEME 培地

酵母エキス (Difco 社製)	3 g
麦芽エキス (Oxoid 社製)	3 g
ペプトン (Difco 社製)	5 g
グルコース	10 g
ショ糖	300 g
蒸留水	1000 ml

pH 無調整、121℃、1 分間高圧蒸気滅菌。

微量元素溶液

塩化第 2 鉄 6 水和物	200 mg
塩化亜鉛	40 mg
塩化第 2 銅 2 水和物	10 mg
塩化マンガン 4 水和物	10 mg
ホウ酸ナトリウム 10 水和物	10 mg
モリブデン酸アンモニウム 4 水和物	10 mg
蒸留水	1000 ml

P 1 0 培地

ショ糖	1 0 3 g
硫酸カリウム	0. 2 5 g
塩化マグネシウム 6 水和物	2. 0 3 g
微量元素溶液	2. 0 m l
蒸留水	8 0 0 m l

1 2 1 °C、1 5 分間の高圧蒸気滅菌後、以下の組成のものを無菌的に加える。

0. 5 % リン酸 1 カリウム	1 0 m l
3. 6 8 % 塩化カルシウム 2 水和物	1 0 0 m l
0. 2 5 M T E S * (p H 7. 2)	1 0 0 m l

* N - トリス (ヒドロキシメチル) メチル - 2 - アミノエタンスルホン酸

R 2 Y E 寒天培地

ショ糖	1 0 3 g
硫酸カリウム	0. 2 5 g
塩化マグネシウム 6 水和物	1 0. 1 2 g
グルコース	1 0 g
カザミノ酸 (D i f c o 社製)	0. 1 g
寒天	2 2 g
蒸留水	8 0 0 m l

1 2 1 °C、1 5 分間の高圧蒸気滅菌後、以下の組成のものを無菌的に加える。

微量元素溶液	2 m l
0. 5 % リン酸 1 カリウム	1 0 m l
3. 6 8 % 塩化カルシウム 2 水和物	8 0 m l
2 0 % L - プロリン	1 5 m l
0. 2 5 M T E S (p H 7. 2)	1 0 0 m l
1 0 % 酵母エキス (D i f c o 社製)	5 0 m l

1 M 水酸化ナトリウム 5 m l

軟寒天培地

ショ糖 1 0 3 g
塩化マグネシウム 6 水和物 1 0 . 1 2 g
寒天 (D i f c o 社製) 6 . 5 g
蒸留水 8 2 0 m l

1 2 1 °C、1 5 分間の高圧蒸気滅菌後、以下の組成のものを無菌的に加える。

3 . 6 8 % 塩化カルシウム 2 水和物 8 0 m l
0 . 2 5 M T E S * (p H 7 . 2) 1 0 0 m l

YMS 寒天培地

麦芽エキス (D i f c o 社製) 1 0 g
酵母エキス (D i f c o 社製) 4 g
可溶性澱粉 (D i f c o 社製) 4 g
寒天 2 0 g
蒸留水 1 0 0 0 m l

2 M 水酸化カリウムで p H 7 . 4 とした後、1 2 1 °C、1 5 分間高圧蒸気滅菌する。滅菌終了後、塩化マグネシウム、硝酸カルシウムを各々 1 0 m M、8 m M と成るように加える。

L A 培地

トリプトン (O x o i d 社製) 1 0 g
酵母エキス (O x o i d 社製) 5 g
塩化ナトリウム 5 g
寒天 1 5 g
蒸留水 1 0 0 0 m l

2 M 水酸化カリウムで p H 7 . 2 とした後、1 2 1 °C、1 5 分間高圧蒸

気滅菌する。

ネマデクチン生産菌種培地

グルコース	10 g
デキストリン	20 g
酵母エキス	5 g
NZ-アミンA	5 g
炭酸カルシウム	1 g
蒸留水	1000 ml

pH無調整、121℃、15分間高圧蒸気滅菌する。

ネマデクチン生産培地

グルコース	50 g
綿実粉	25 g
炭酸カルシウム	7 g
蒸留水	1000 ml

pH無調整、121℃、15分間高圧蒸気滅菌する。

産業上の利用分野

以上のごとく本発明は、ネマデクチンを生産するストレプトマイセス属に属する微生物に、ネマデクチン類似化合物を生産する微生物のDNAを導入してC-13ヒドロキシルネマデクチン及びC-13グリコシルネマデクチンを生産蓄積せしめて、採取することができる。このように、分子遺伝学的手法によってC-13グリコシルネマデクチン生産菌を作製することで立体選択的に配糖化されたネマデクチンを効率的に取得することができ、抗昆虫・抗寄生虫等の生物活性の改善が期待される。

請求の範囲

1. ストレプトマイセス・シアネオグリセウス・サブスピーシーズ・ノンシアノゲナスに属し、C-13位配糖化ネマデクチン生産能を有する菌株。

2. C-13位配糖化ネマデクチン生産能を有する菌株がストレプトマイセス・シアネオグリセウム・サブスピーシーズ・ノンシアノゲナス (*Streptomyces cyaneogriseus* subsp. *noncyanogenus*) $\Delta n e m A 4::v p h$ $a t t B_{T61}::a v e A 4-a v e A 3-a v e E$ $a t t B_{\phi c31}::a v e R$ $a t t B_{R4}::a v e B I-B V I I I$ (FERM BP-8394)である請求の範囲第1項記載の菌株。

3. ストレプトマイセス・シアネオグリセウス・サブスピーシーズ・ノンシアノゲナスに属し、C-13位水酸化ネマデクチン生産能を有する菌株。

4. C-13位水酸化ネマデクチン生産能を有する菌株がストレプトマイセス・シアネオグリセウス・サブスピーシーズ・ノンシアノゲナス (*Streptomyces cyaneogriseus* subsp. *noncyanogenus*) $\Delta n e m A 4::v p h$ $a t t B_{T61}::a v e A 4-a v e A 3-a v e E$ $a t t B_{\phi c31}::a v e R$ (FERM BP-8395)である請求の範囲第3項記載の菌株。

5. ストレプトマイセス・シアネオグリセウス・サブスピーシーズ・ノンシアノゲナスに属し、C-13位水酸化ネマデクチン生産能を有する微生物を培地で培養し、培養物中にC-13位水酸化ネマデクチンを生産蓄積させ、該培養物よりC-13位水酸化ネマデクチンを採取することを特徴とするC-13位水酸化ネマデクチンの製造法。

6. ストレプトマイセス・シアネオグリセウス・サブスピーシーズ・

ノンシアノゲナスに属し、C-13位配糖化ネマデクチン生産能を有する微生物を培地で培養し、培養物中にC-13位配糖化ネマデクチンを生産蓄積させ、該培養物よりC-13位配糖化ネマデクチンを採取することを特徴とするC-13位配糖化ネマデクチンの製造法。

7. ストレプトマイセス・シアネオグリセウス・サブスピーシーズ・ノンシアノゲナスに属し、ストレプトマイセス・アベルミチリスのエバーメクチンアグリコン生合成遺伝子群を保有するC-13位水酸化ネマデクチン生産能を有する微生物。

8. ストレプトマイセス・シアネオグリセウス・サブスピーシーズ・ノンシアノゲナスに属し、ストレプトマイセス・アベルミチリスのエバーメクチンアグリコン生合成遺伝子群を保有するC-13位水酸化ネマデクチン生産能を有する請求の範囲第7項記載の微生物の製造法。

9. ストレプトマイセス・シアネオグリセウス・サブスピーシーズ・ノンシアノゲナスに属し、ストレプトマイセス・アベルミチリスのエバーメクチンアグリコン生合成遺伝子群を保有するC-13位配糖化ネマデクチン生産能を有する微生物。

10. ストレプトマイセス・シアネオグリセウス・サブスピーシーズ・ノンシアノゲナスに属し、ストレプトマイセス・アベルミチリスのエバーメクチンアグリコン生合成遺伝子群を保有するC-13位配糖化ネマデクチン生産能を有する請求の範囲第9項記載の微生物の製造法。

11. ストレプトマイセス・シアネオグリセウス・サブスピーシーズ・ノンシアノゲナスに属し、ネマデクチンアグリコン生合成遺伝子群nemA3-4オペロンのKS10をコードする領域にバイオマイシン耐性遺伝子を挿入したネマデクチン非生産性の菌株(KS10挿入変位株)。

12. ネマデクチン非生産性の菌株が、ストレプトマイセス・シアネオグリセウス・サブスピーシーズ・ノンシアノゲナス (*Streptomyces cyaneogriseus* subsp. *noncyanogenus*) $\Delta nemA4::vph$ (FERM BP-8393) である請求の範囲第11項記載の菌株。

13. ストレプトマイセス・シアネオグリセウス・サブスピーシーズ・ノンシアノゲナスに属し、上記KS10挿入変位株にストレプトマイセス・アベルミチリスのエバーメクチンアグリコン生合成遺伝子群 *aveA3-4* を保有し、*NemA1-2* 及び *AVES3-4* とのハイブリッドPKSを形成しうる菌株。

14. ストレプトマイセス・シアネオグリセウス・サブスピーシーズ・ノンシアノゲナスに属し、*NemA1-2* および *AVES3-4* とのハイブリッドPKSを形成しうる微生物でストレプトマイセス・アベルミチリスのエバーメクチン生合成遺伝子群の制御遺伝子 *aveR* を保有する菌株。

15. ストレプトマイセス・シアネオグリセウス・サブスピーシーズ・ノンシアノゲナスに属し、*NemA1-2* 及び *AVES3-4* とのハイブリッドPKSを形成しうる微生物でストレプトマイセス・アベルミチリスのエバーメクチン生合成遺伝子群の制御遺伝子 *aveR* 及びエバーメクチン配糖化およびオレアンドロース生合成遺伝子群 *aveBI-BVIII* を保有する菌株。

FIG. 1

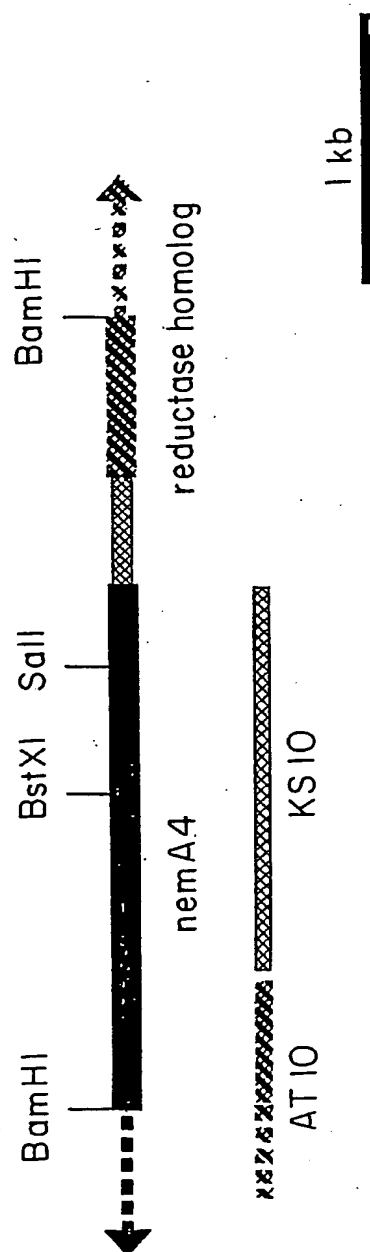


FIG. 2

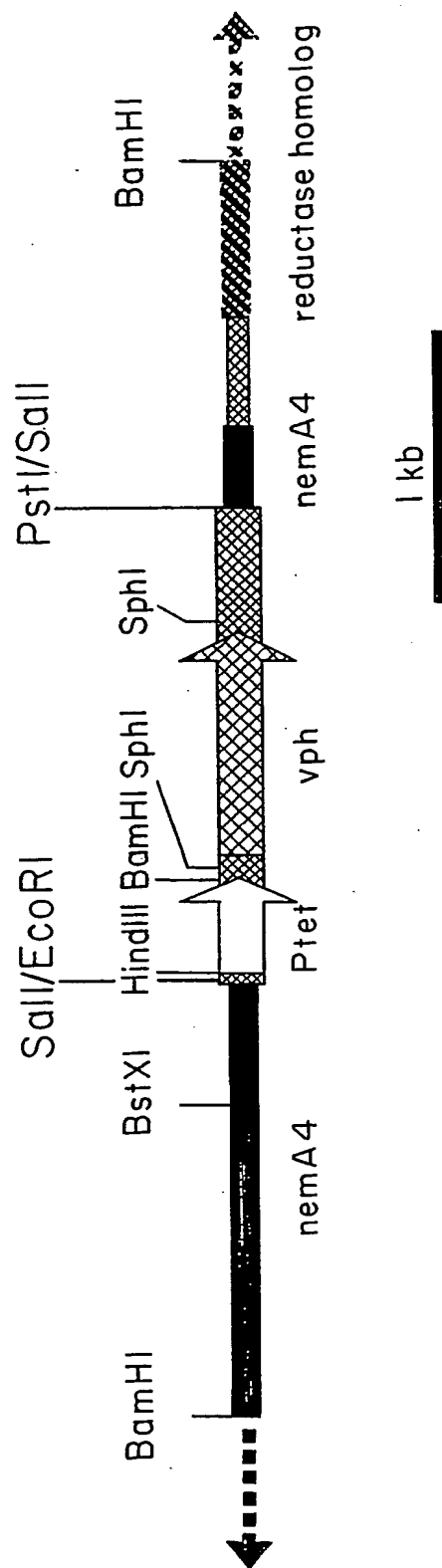


FIG. 3

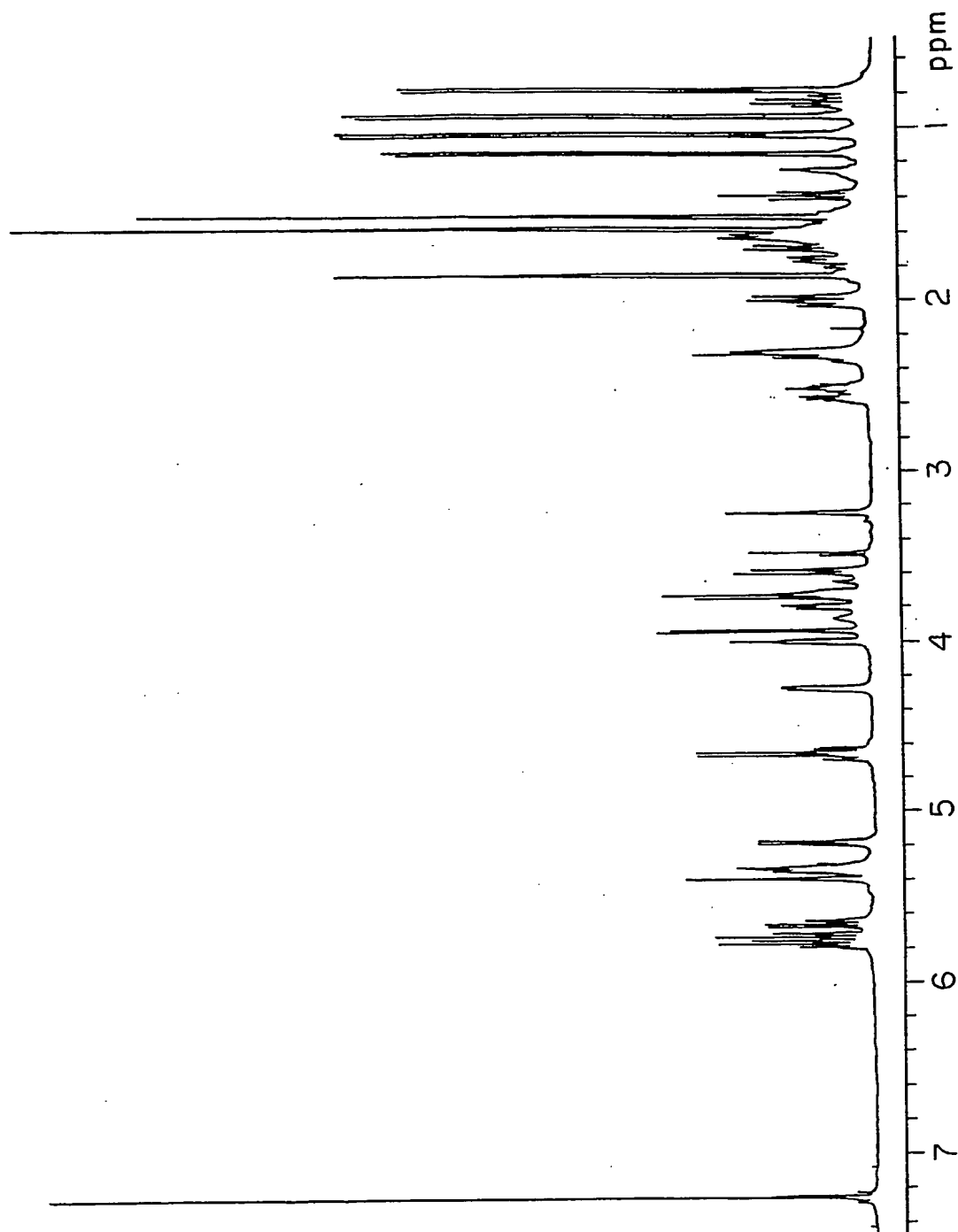


FIG. 4

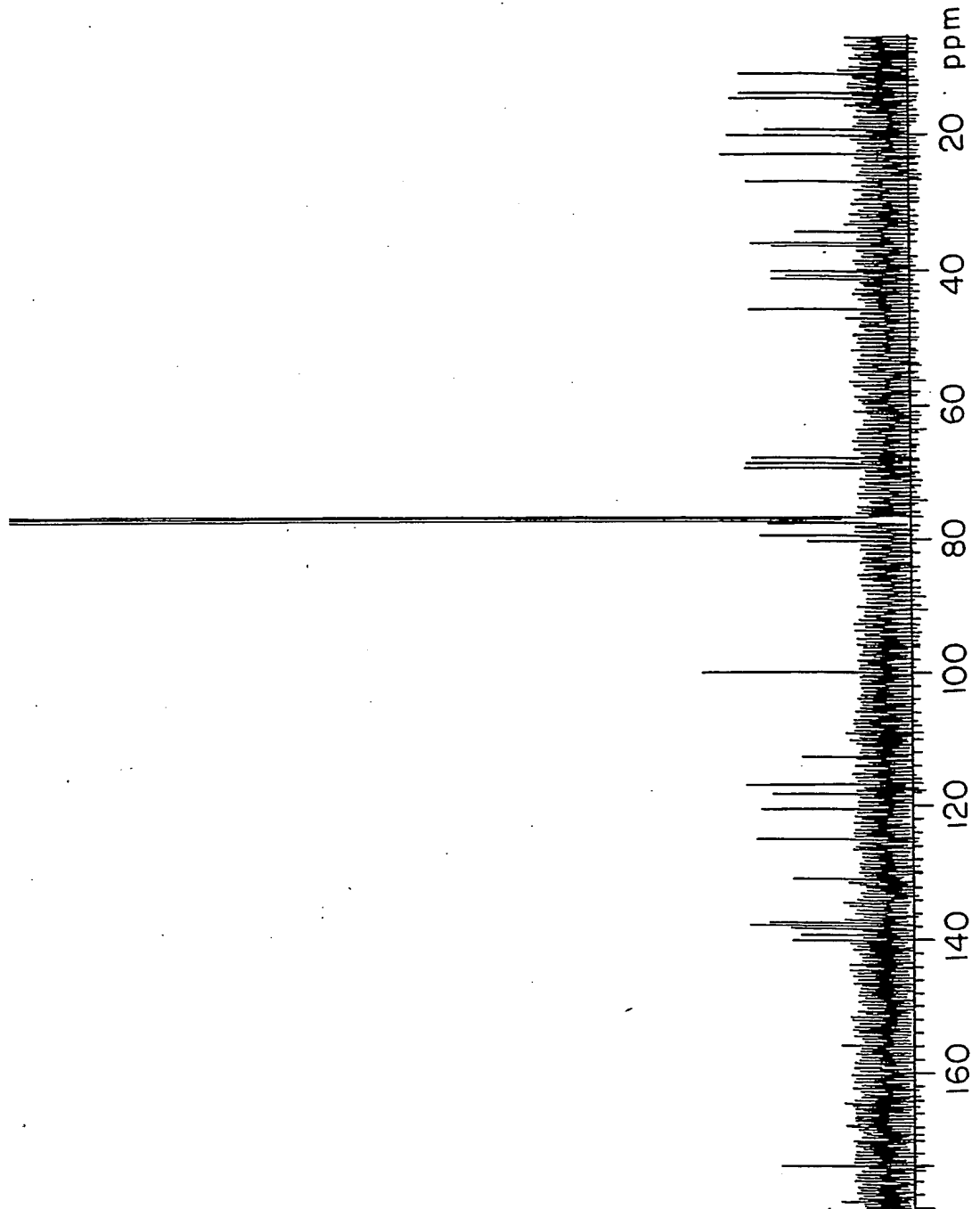


FIG. 5

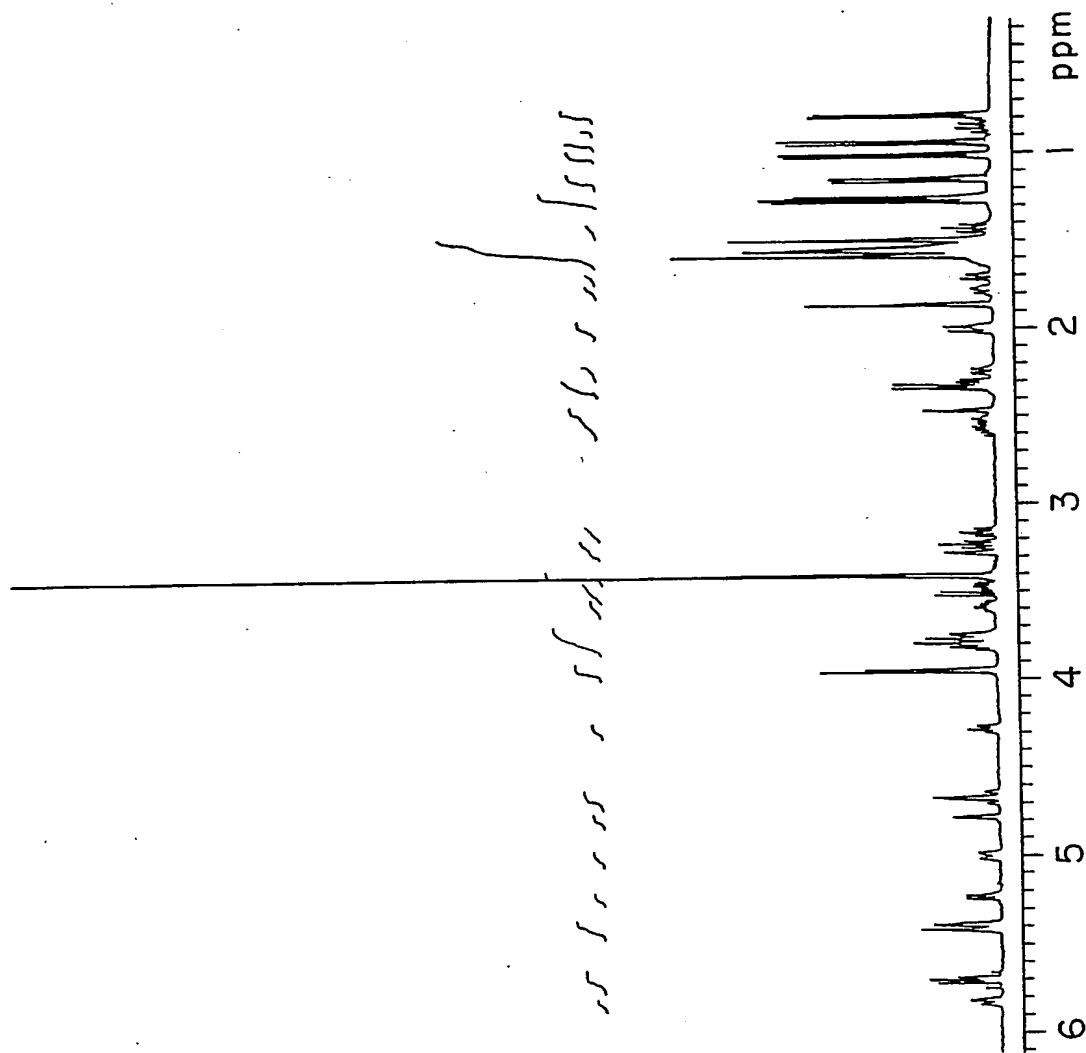
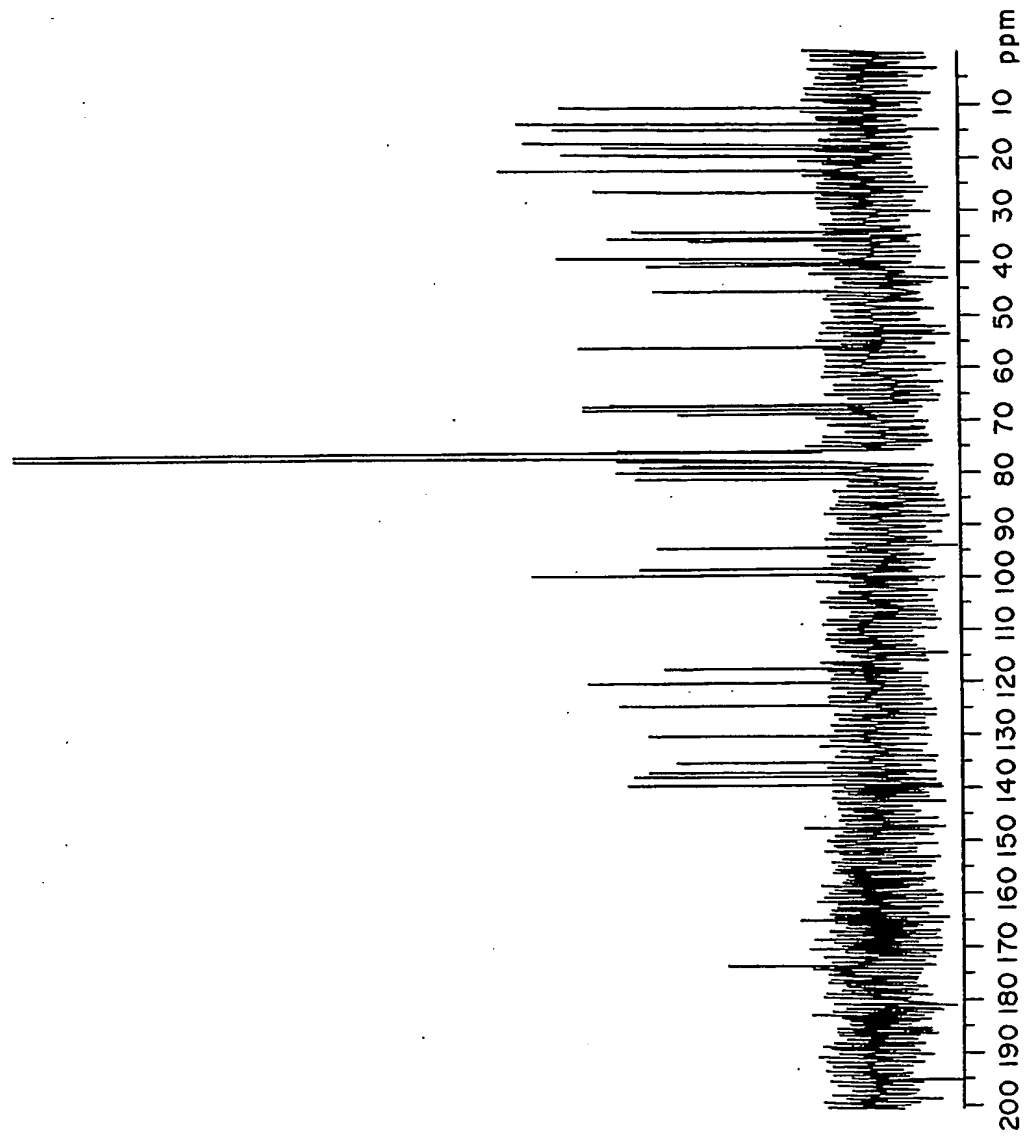


FIG. 6



WO 2004/111230

配列表

SEQUENCE LISTING

<110> The kitasato Institute

<120> ストレプトマイセス属に属するネマデクチン生産能を有する菌株、該菌株を用いるネマデクチンの製造法

<160> 6

<210> 1

<211> 23

<212> DNA

<213> Streptomyces avermitilis

<400> 1

gtgctgcaag gcgattaagt tgg

23

<210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> Streptomyces avermitilis

<400> 2

tccggctcgt atgttgtgtg ga

22

<210> 3

<211> 39912

<212> DNA

<213> Streptomyces avermitilis

<400> 3

gaattcttcg gcatcagccc ccgcgaagcc ctcgccatgg acccccagca acgactcctc

60

ctcgaaaccg cctgggaaac catcgaacac gccggcatca acccccacac cctccacggc

120

acccccaccg gagtcttcgc cggaatcaac gctcaagacc acgcgcgcga tatccgccaa

180

agccgtgatg tggagaccat cgaggggtac gccctgaccg gcagttcggg aagtgtggcg	240
tccggccggg tggcctacac gctcgggctc gaaggccccg cgggtgtcggg ggatacggcg	300
tgttcgtcgt cgttggtggc gttgcattgg gcggcgagg cgttgctggtc gggtagtgt	360
tcgatggcgc ttgccggggg tgtgacggtg atgtcgtctc cgggtacgtt tgtggagttc	420
tcacgtcagc ggggtctggc cgcggacggg cgggtcaagg cctattcggc ggtgctgac	480
ggtaccggct gggccgaggg tgtggggatg ctgctgggtg agcggctctc cgacgccgt	540
cgcaacggtc accgtgtcct ggccgtggtg cgtggcagtg cggtaacca ggacggtgcg	600
agcaacggtc tgaccgcgcc caacggggcc tcccagcagc gtgtcatccg tcaggccctg	660
gccaatgcgg gactgacccc ggccgatgtc gacgcagtg agggccacgg caccgggacc	720
actctggggg acccgatcga ggcccaggca ctctggccg cctacggaca acaccgcccc	780
caccaccgcc cttgtggtt gggatccctc aaatccaaca tcgggcacgc acaggccgcc	840
gcgggcgtgg gcggagtcac caagatggtg atggccctgc gcaacgggct gctgccacag	900
accctccacg tggacgagcc cccccccag gtcgactggt ccacaggcgc agtacaactc	960
ctgacacaac cgggtgccctg gcccgccgac ccggccggcc ggccacgcca cggcgcggtg	1020
tcacatctcg gcgtcagcgg caccaacgcc cacatcatcc tcgaagaagc acccactccc	1080
caggacagcg ataccgacga cgaaccgct gccaacgcac cagccctgcc ccatccctc	1140
cctcttcccg tgccggtgtc ggcgaggtct gaggcgggtg tcggggcgca ggcacaggcg	1200
ttgcgccagt acgtggcagc ccgcccggac atgtcacctg ccgacattgg tgcgggtctg	1260
gcccgcggcc ggccgtact ggaacacgc gccgtcatcc tggccgcgga ccgcgaggaa	1320
ctggcgagg cactgacagc cctggcagcc ggcgaaaccc accccacat caccacaggc	1380
cacaccggg gcggtgaccg cggcgcgctc gtcttcgtct tcccggaca gggcggccag	1440
tgggcgggga tgggcctgac cctgctcacc tcctcaccgg tgttcgccga acacatcgac	1500
gcatgcgaga aagccctcac cccctgggtg ccctggctcc tgaccgacat cctgcaccgc	1560
gaccccgacg accccgcatg gcaacaagcc gacgtggtcc agcccggtg cttcagcatc	1620
atggtctccc tcgccgccct gtggcgctcc tacggcatcg aaccgacgc ggtcctcggc	1680
cactcccagg gagaaatcgc cggcgccac atctgcggcg cactcagcct gaaagacgcc	1740
gccaaaaccg ttgcaactgc cagccgcgca ctggccgcg tacgaggccg gggcgccatg	1800
gcctcactgc ccctgccgc ccaggacgtg cagcagctca tttccgaacg gtgggaaggg	1860
cagttgtggg tggcagccct caacggcccc cactccacca ccgtctccgg cgacaccaag	1920
gcggtggatg aggtgctggc gcaactgacc gacaccggcc tacgggcca acgcatcccc	1980
gtcgaactag cctcccactg cccccacgtc caaccctcc acgacgaact cctgcacctg	2040
ctgggagaca tcacccccca gccgtccacc gtgccgttct tctccaccgt ggaaggcacc	2100
tggttgga caacaaccct ggacgcggcc tactggtacc gcaacctcca ccagcccgtc	2160
cgcttcagcc acgcatcca gaccctgacc gacgacggac accgcgcctt catcgaaatc	2220
agccccacc ccacctcgt ccccgccatc gaagacacca ccgaaaacac caccgaaaac	2280
atcaccgga ccggcagcct ccgcgcggc gacaacgaca ccaccgctt cctcaccgcc	2340

ctcgcccaca cccacaccac cggcatogggc acaccacacca cctggcacca ccactacacc	2400
caaaccacacc cccaccccaa cccccacacc cacctcgacc tgcccaccta ccccttccaa	2460
caccagcact actggctcca accaccocacc acaacaaccg acctcaccac caccggcctc	2520
acccccaccc accacccctt cctcaccgcc acactcacc cgcgcgacaa caacacacaa	2580
ctactcaccg gccgcctctc cctacgcacc caccctgggc tcaccgacca caccgtcgcc	2640
ggcatggtcc tcctgccggg caccgcgctc ctggaactcg ccctccaagc cggcgaaagg	2700
gtggactgcc ctgggggtga ggaactgacc ctgcacgcac cgttggtgat cccgcacacc	2760
gaggacgtga cgttgacagt caccgttcgg gcagccgatg agagtggcca tcgcgcctc	2820
gcgatccact cgtactccgg caccgcgtcg tcggcggacc gggagtggac ccgtcacgcc	2880
acgggcctcc tcacacacca cgcgcgacacc gatcaccgtg ccgacacgca caccgacgg	2940
tgctctggcg ggaactggcc cccgcccggc gcgcagccca tcgaactggg cgacgtctac	3000
ggctgtatgg cggcggactc ggacatcgcc tacgggcccgg tcttcagggg gctgcacgcc	3060
gcctggaggt tcggcgacga tgtcctggcc gaggtgcgtc tgccggaaga ggctctgcgc	3120
gatgtccgg cggcggcctt cgggtgtcac ccggccttgc tcgacgcggc cctgcacgcc	3180
acggcgctca cccccagaa cggggacggc tcgacggaga acgtcgccca ggagagcatg	3240
cctgaccggc cagcccacca ggcgcgactg ccgttcagct ggagcggcgt gtccctgcac	3300
acggcgggca gttccgtgtt gcgcgtacgg ctgtcgcgca gtccgcagca cggtaatgcc	3360
gtggccctca ccgcggccga cgaggacggt cggccggtgg tgacgatcga gtcgctcgcg	3420
ctgcggccgg tgtccaccga ggagctgcgc gcggccgcgg atcgtacgcc cgagcacgag	3480
tcgctcttcc gactggactg ggtttccgta ccagtgcgcg ccaacgcccc ttgcccacc	3540
gcggaccggc cctgggcggt catcggcgcg ggccttcccc acctgcccgg cctgacggag	3600
cacgagcacg tgaccgcgta tgacgagccg gcggacctgc ttctggctct ggaccgcgg	3660
gctccgcgc cgggtgtgct ggtcgttagt ggtgtcgcgc acaccgaagc ccgggagtat	3720
tccgccgaag ccccggggga gcgcgggacc gaggcctgcg agggccggcc ggacgtcgtg	3780
cacgtgggcg tcgtgcacac ggctgcctg caccggctg ccgcgcagat gttggccagg	3840
ctccaggcct ggctgggcca cgagcgcctc gcagacagcc ggctgctcgt cctgacgtgc	3900
ggcgcggctc cccgcgcctc cggcgacgat gcgacggacc tgcccggggc cgcctgtgtg	3960
gggctggtgc gttcggcgca gtccgagcac ccggaccgca tcacgtgct ggacttcgag	4020
cggggcacag agggcgagcc cggtcagctg gcgacggcgc tgaactgcgg ggagcggcag	4080
cttgccgtcc gcccggagg gctgttcacg ccacggctgg tgccgcgcgc acgtgtcgc	4140
gacgccgtac ccgccgtacc cgcctgtggc gtaccgtcag cgggtcacgc agccgtaccg	4200
gcagcgggtc ccttccttcc gggcggaacg gtgtgatca ccggcggaac cgggtgtcctg	4260
ggcggctcgt tggcccgcca tctggtggag gcgcacggcg tacggcatct gttgtggcg	4320
ggtcggcgcg gaccggacgc cgagggtgcg ccggagtgtc gggcgagct cgggtggctc	4380
ggcgcgacgg tggaggtcgt cgcctgcgac gcggcggacc ggcagcagct ggccgacctg	4440
ctgacacgga tccccgacga tcggccgctg accggtgtcg tgacagtgc gggcatcctg	4500

gacgacggcg tgatcacgtc gctgtcgccg gagcggctcg gggccgtcct cggggccaag	4560
gcggacgctg cgctgcttct cgacgagctg acgcgcgggg cagagctgtc ggctttcgtc	4620
atgtttctct cccgctcgcc ggtggtcggc tcgcccgggc agggcaacta cgccgccgcc	4680
aacgccgtcc tcgacttctt tgctcatcgc cgccgcggcg aggggctgcc cgccgtctct	4740
ctcgccctggg gcctgtggga agagggcaca gggatgacgg gccacctcga cgtcgacgac	4800
catgcgcgga tcagccgcgc ggggaatgcgg ccgctgccga ctgccgaggc tctggcgctg	4860
ttcgacgcgg ccttggccga cggcgagccg ttcctgatgc cggctcggct cgacctcacg	4920
gccgtacggg ctggtgccgc gtccgcaccg gtgcgcggc tgctgcaagg tctgcttcag	4980
ctgcctcggg cccgctcgcc cgccgcggcc cccggccatg gggccccggc ggcggaacgag	5040
ggggcgccct ggcgtgagcg tctggcccg cagagtgcg gtgagcgag gcaggcgctg	5100
ctgcgcctgg tcgggtcgca tgtcgcgcg gtgctcgcc atagcgggtc cgacggaatc	5160
gacgcacgc gggcgcttcg cgagctgggg ttcgactcgc tcacggcggt cgagctgcgc	5220
aaccgtctca cggccgcgac gggcctgcgg ctgcgggcca cgctggcctt cgatttcccg	5280
accccgacag cgctggccga gcaactgggc gagcgtctgc ttcccgacca ggaggccacg	5340
ggcgagcaag cggcgatca gctctccggc ggcagcgagg aggacgtacg cagcctcctg	5400
acgtccattc cgatcggcag gctgcgggac gcggggctcc tcggggccct gctcacgtc	5460
gcggacacgg gccgcggcgc ctgcggcgcc gccgcaggtc cggaggacgc gccgccctcc	5520
ggccaggaca caccggctcc cgtctcgatc gacgagatgg acatcgacga cctgatggat	5580
ctggcgacg ggcattggc cgacccgcc cgtgagcccg ccgacgcaga ggactcgtcg	5640
tcacacgaa accggacaca ccacacacac gaaggtgaga cagcgtgaac ccatccgagc	5700
cgctcggcct gcccacgaa cgtgtagtag acaccgcacc gtccgatgcc acgctctcac	5760
ccgaggccgg cctgaacagg tcaggagcgc tgccccgtga actgctgtcg ttgccgggtg	5820
tggtgtgggc cggggtcgcc ctgctgttcc tggccctgca ggcgtacgtg ttcagccgct	5880
ggggcgccga cgggtggctac cggctgatcg agacggcggg ccagggtcag ggcggcagca	5940
aggatacggg gactaccgat gtggtctatc ccgtgatttc cgtcgtctgc atcaccgccg	6000
cggcgcgctg gctcttccgg aggtgccgtg tcgaacgacg gctgctgttc gacgcccttc	6060
ttctcctcgg gctgctgttc gcgagctggc agagcccgt catgaactgg ttccattccg	6120
ttctcgtctc caacgcgagt gtgtggggcg cgggtgggttc ctgggggtccg tatgtgcccg	6180
gctggcaggg ggcggggccg ggtgcggagg cggaaatgcc gctggcgctg gcctccgtct	6240
gcatgtcggc tctgatcgtc accgtgctgt gcagcaaggc actgggggtg atcaaggccc	6300
gccggccggc atggcgagc tggcggtg tctggccgt gttcttcacg gccatcgtgc	6360
tcggctctgt cgagccgctg ccgtccgcct cggggatcag cgtatgggccc agagcgctgc	6420
ccgaggtgac cttgtggagt ggcgagtggt accagttccc cgtgtatcag gcggctgggt	6480
ccggcctggt ctgctgcatg ctgggctcgc tgcgttctt ccgcgacgaa cgcgatgagt	6540
cgtgggtgga acggggagcc tggcggttc gcgaacgggc agcgaactgg gcgcgtttcc	6600
tcgccgtggt cgggtggggtg aatgccgtga tgttcctcta cacctgtttc catatcctcc	6660

tgccctcgt cggtaggacag ccgcccagacc aactgccgga ctccttccaa gcgcccggccg 6720
cttactgagt tcagggcagg tcggaggaga cggagaaggg gaggcgaccg gagttccggt 6780
cacctcccct ttgtgcatgg gtggacgggg atcacgctcc catggcgggcg ggctcctcca 6840
gacgcaccac actcctcggg tcagcgatca tgcggagtcg gttggggaag acgtgagtgg 6900
ccttcgtctt gggccggacc tcgtcgcccg gaagggcgtg tagtcgccag tgggaggcga 6960
cgaccgcgac cgtaacggcc gtctcgagaa gggcgaagtt gtgcgcgatg catttgtagg 7020
tgccgagcgc gaagggcacc caccgcccct tgggaactcc gcggctcgat cccttggttt 7080
cccagcggcc ggggtcgaga cgttcgggtt cggggtagca acgtgggtcg cgtgggatgg 7140
cgtacgcgct gtacatgacc tccacatcgg cgggcaggtc gtgaccgccg agtcgtaccg 7200
gccgcaccgt ccggcgggac cccaccagc cggggtatct gcgcagtgc tctttcacga 7260
ggttctgtgt gtacggcagc cgggggaggt cctcgtcgtt gggcaaccgc ccgcccagga 7320
ccgtgtcgag ctctgcgtgc agccgactct cgatctcggc gttctgtccg agtcgtgga 7380
aaatccacgc cgtaatggca gctgggcccgc cgatccggc caccgcgatt cccatgacct 7440
cgtcatggac ctcctggtcc gtcattggagg caccctcggc gtccgtcgcg cgcagcatcg 7500
tcgagagcag gtcaccgtgg tcgcccgcct cggcgcgata cggcgtgatc gcctcccga 7560
tcgttgcgct cgtacggccc acggaccgct tgcccgcggt gggaaagaacc tcgtaaaggg 7620
tgggggcgag agcactcagc cgggccacct tcagaatgtc gtgtccggtt ttccgcagcg 7680
ccgcctcggc cttcgcgccc aggtcggaga agaacagcgt cttcgtgatc atggcaagcg 7740
acaggctcgca gggggcctgc tcaacgtcca ccacctgcc agcgtccag gaatcagcg 7800
tctcctgcgc gggggccgcc atggtggcga catagctctc gaggcgctgg cggtggaacc 7860
ctggctgcat ccgcctccgc tgcgcgggt gcgtctccc cgatacggct acgaggatgg 7920
ggccgatgaa cgggctcgcg ccctgtgcgc ccttgcctcg ggtgaaatcg cccgatccgg 7980
aggagaccag catggtccgc accagggtccg ggtgcgtggc gaggtaggcg gttttcggcc 8040
cgaggcggag cttgagcagg tctccgtgat ctgctgcgga gcgaaggaaac tccaggggct 8100
gccgcacaa cggcggcaca tggccgacga cggccaggc gccggggcgc tcgggaatgc 8160
tgctcgtcga ctgggacatc acgagtgtc ctttgcgggg tgaagggggg tggtgggag 8220
gggaacgaca gtgacgagtg aagggggagg tgtgggggtt ggctcgcc cgggggtgag 8280
cgtggacatg ggagtgggag ggagtgaagt gagctcggag tggtttcttg gttcattga 8340
gattcgaatc cgacttccct gtcgatgaga gcgaacatct cctcgtccga tgtctctgcg 8400
aggtcggggg cgggtgcgtc gccgttcaac ttctgggcga gggaatgcag tcgggaggcc 8460
agccgcgtgc gcgcgccgtc gtccagcggg gcagcggagg atgtggtgga ggagagcact 8520
accgcctcca gccgctcgag ctccgagagc agcaggggca gcccggggg tgctgttgcg 8580
gcgtccggt cggccgcggc ggtgagtccc ttgctgacga gttgtgtgtg gagtggtgg 8640
gtgaggggtg tggggttggg gtggtcgaag gcgaggggtg tggggaggcg gagtccggtg 8700
gtgtgggaga gccggttgcg tagttcgacg gcggtgaggg agtcgaagcc gaggtcgcgg 8760
aacgcgcggt cgggggggat ggtgtcgggg gtggtgtggc ccaggacggt ggcgatgtgg 8820

gagcggacca	gggagaggag	ggtggtgtgc	tgtgttcgt	gtgtctggcc	ggccagccgg	8880
ccgtgcagct	gggagccgtt	gtccgcacca	ccggtagtgg	tggtaggggt	ggtgcggcgg	8940
cggttgccgg	gcaggaggtc	ctgcagcagg	ggcggcaggg	gcggggcggg	acgcaggtcg	9000
gccccgagca	ggaccggccg	gtccagagcc	agggccgcac	cgaagagggc	cagtgcgtcc	9060
ggggtcgaca	tgggatgcag	accggaacgg	atgatgcgcc	ggtggtcggg	ggcggccaga	9120
tgcccggtca	tcccgtgggc	ctcttccac	agccccacg	ccagcgacac	ccccggcaga	9180
cccgccggcc	ggcgccggta	cgccagcgcg	tccagagcgg	cattggccgc	ggcgtagtgt	9240
ccctgccccg	ccgaccccag	gatcccccg	gccgaggaga	acagcacgaa	cgccgacagc	9300
tccatacccc	gcgtcagctc	atccagcaaa	agagcggcat	ccacctggc	cgcgaaacac	9360
gtgcccagcc	gctcggggcg	gagagagggc	atcgtcgcat	cgtccagcac	accagccgca	9420
tgcacgacac	ccgtcagcgg	acacccggca	ggaacaccct	ccagcagccg	gaccacctcc	9480
cgccgctccc	ccacatcaca	cgcaacaatc	cgcacctccg	cccccaacgc	ggccagctcc	9540
gccccgaaac	cctccgcacc	cggagcatcc	ggaccacgcc	ggctcaccaa	caacagatcc	9600
cgcaccccac	acacaccagc	cagatgccgc	gccaccgccg	caccacgac	accggtccca	9660
cccgtcacca	acaccgaccc	acccgacaac	cacggcaaca	cctcccgacc	cgatacatca	9720
accggcgact	caagtcgtgt	caggcgtgcg	gccagcacc	gctcaccacg	caccgccaac	9780
tgcggctcac	cacacgccac	caccgcagcc	acacgccac	catccagacc	agaccccata	9840
ccggcctcgt	tgcgggcac	gcggtcagcg	ccgctgtcga	ggtcgggtgc	caggctcagg	9900
aggacaaacc	ggtccggatg	ctcagcctgc	gccgaccgca	ccagccccca	caccgcccga	9960
cccaccacat	ccaccggggc	atccaccggg	ccgtcctccg	ggccggccac	caccgcaccc	10020
cgggtcacca	ccaccagccg	cgaaccgca	aaccgctcca	gccccagcca	cccctgcacc	10080
acacccaaca	ccccaccaac	aacctcacc	acaccaccgc	caccaccgcc	gccatcgga	10140
ccggcatccg	ggcaccgcaa	caccaccacc	cccggcacac	catcctcctc	agccgccaga	10200
ccaacgaggt	cgtcggcacc	atccagcacc	accaccgatg	ccccgcccga	caccagtaca	10260
tctgagggca	cctcaaccca	cttcatgtcg	aagagctcag	cgcgctgtac	ggcgcgctcg	10320
gcagctcgca	attcgtccgc	cgccaacggg	cgcaccgcca	acgcctcgac	ggacgccacg	10380
ggcgtaccgg	tgtcatccgt	gaccagcacg	gaaactgcgg	cgtggccgct	gttcggatcg	10440
gccccggaga	gtcgcacgcg	caacgacgac	gcattggcgg	cgtgcagcgt	cacaccgggtg	10500
aaggagaacg	gtacggatcc	ctgcggcaga	ctgcccgcag	gcgcaaaggc	cgtgcgtgc	10560
aaggcagcat	ccagcagtgc	cggtgacagg	ttgtacgcgg	atgcctcgcc	gtgcacctgt	10620
tctggaaggg	gaacctcggc	aaacacctcg	tctcccagac	gccaggcagc	agtcagcccc	10680
cggaatgcgg	ggccatagac	aaagccattt	gcctcgtagt	cgccatacaa	ggctgccaat	10740
tcctcatcag	cacagcgaac	tgcgcccgc	ggcggccaca	tcgacagatc	atcgtggcta	10800
cgccctgtct	caatgcgcga	ggtcttggtt	cccagaacgg	ccgtggcgtg	atgacgccag	10860
ggagccgctg	cgggggcggt	ctcgcttcgc	gagtagatcg	tcagtgaacg	agtgtcgggtg	10920
tcgtccgggtg	gattgatgtg	cacctgaacg	tcgacggcac	cctcacgggg	gatgacgaga	10980

ggcgtgtgga gggcgagttc ttcgaggtgg tcggtcgtgg ttgcttgag ggcgagttcg 11040
aggagggcgg ttcctggcac aagagtggta ccgacgacgg tgtggtcggg gagccagggg 11100
tggtgtcgta gggagaggcg gccggtgagt agttgtgtgt tgttggtggc gagggtagt 11160
gttgccgtga ggaggggggtg gtgggtgggg gtgaggccgg tgggtggtgag gtcggtgtc 11220
gtgggtgggtg gttggagcca gtagtgctgg tgttggaagg gtaggtggg caggtaggg 11280
tggtggtgtg gggggtgggg gtgggtttgg gtgtagtggt ggtgccagggt ggtgggtgtc 11340
cgaatgccgg tgggtgtgggt gtgggagagg gcggtgagga agcgggtgggt gtcgttgtcg 11400
ccgcgccgga ggctgccggt cgcggtgatg ttttcggtgg tgttttcggt ggtgtcttcg 11460
atggcgggga cgaggggtggg gtggggactg atttcgatga aggggcgggtg tccgtcgtcg 11520
gtcagggtct ggatggcgtg gctgaagcgg acgggctggt ggaggttgcg gtaccagtag 11580
gcggcgtcca gggttgtggt gtaccagacc aggtgcccta cgacggtgga gaagaacggc 11640
atggtggacg gctggggggt gatgtctccc agcaggtgca ggagttcgtc gtggaggggt 11700
tggaactggg ggcagtggga ggcgtagtcg acggggatgc gtttgggccc taggccggtg 11760
tcggcacagt gggtagggag ttcttctact gcggtggtgt cgccggagac ggtggtggag 11820
tgggggccgt tgagggctgc caccacaac tgccctccc accgttcgga aatgagctgc 11880
tgcacgtcct gggcgggcag gggcagtgag accatggcg cccggcctcg tacggcggcc 11940
agtgcctggc tgcgcagtgc aacggttttg gcggcgcttt tcaggctgag tgcgccgag 12000
atgtggcgcg cggcgatttc tccctgggag tggccgagga ccgctcggg ttcgatgccg 12060
taggagcgcc acagggcggc gagggagacc atgatgctga agagcacggg ctggaccacg 12120
tcggcttgtt gccatgcggg gtcgtcgggg tcgcggtgca ggatgtcggg cagggaccag 12180
ggcaccacag gggtaggggc tttctcgcat gcgtcgatgt gttcggcgaa cacgggtgag 12240
gaggtgagca gggtcaggcc catcccggcc cactggccgc cctgtccggg gaagacgaag 12300
acgacgccgc cgcggtcact gcccgggtg tggcctgtgg tgatgtgggg gtggggttcg 12360
ccggtgcca gggctgtcag tgcctgcgc agttcctcgc ggtccgcggc caggatgacg 12420
gcgcggtgtt ccagtacggc ccggccgcgg gccagaccg caccgatgtc ggcaggtgac 12480
atgtccgggc gggctgccac gtactggcgc aacgcctgtg cctgcgcccg caaccggcc 12540
tcagacctcg ccgacaccgg caccggcacc ggcaccggt cagactcagc caccggaagg 12600
gctggattcg gagcaccac cgacaccca ccaccggcag caccgcccgc cgccgaggc 12660
gcctcctcca aaatcacatg ggcggtggtg ccgctgacgc cgaatgatga cacgccggcg 12720
tggcgtggcc ggccggccgg gtcggcgggc cagggcaccg gttgtgtcag gattgtact 12780
gcgcctgtgg accagtcgac ctgggggggt ggctcgtcca cgtggaggggt ctgtggcagc 12840
agcccgttgc gcagggccat caccatcttg atgactcgc ccacgcccgc ggcggcctgt 12900
gcgtgcccga tgttgattt gagggatccc agccacaagg ggcggtggtg gggcggtgt 12960
tgtccgtagg cgccaggag tgccggggc tcgatcgggt ccccagagt ggtcccgggtg 13020
ccgtggccct cactgcgtc gacatcgcc ggggtcagtc ccgcattggc cagggcctga 13080
cggatgacac gctgctggga gggccggtt ggccggtca gaccgttgc cgaccgtcc 13140

tggttgaccg cactgccacg caccacggcc aggcacacggt gaccgttgcg acggggcgctcg	13200
gagagccgct ccaccagcag catccccaca ccctcggccc agccgggtacc gtcagcagcc	13260
gccgaatagg ccttgcaaccg cccgtccgcg gccagacccc gctgacgtga gaactccaca	13320
aacgtacccg gagacgacat caccgtcaca cccccggcaa gcgccatcga aactcacc	13380
gcacgcaacg cctgcgcgcg ccaatgcaac gccaccaacg acgacgaaca cgccgtatcg	13440
acgggtcacgg cgggaccctc aaggccaaag ctgtaggcca cccggccgggt cgcgacgctg	13500
cctgcgctgc cgttggcgat gaggccttcg aaaccctcgg ggacatggtg gagacgcgcg	13560
gcgtagtcgt ggtacatcac cccggcgaag acaccggtac gggagccacg catcgacagc	13620
ggatcgatac ccgcccgtc gaacgcctcc cagcagctct ccagcaacaa ccgctgctgc	13680
ggatccatcg ccaacgcctc acggcgactg atcccgaaga agtccgcacg gaactcccc	13740
gcctcataca aaaacccgcc ataccgcgcg tacgacgtcc ccgaccggtc agggtcggaa	13800
tcaaacaacc cctccagatc ccacccccga ccggcgggaa attcaccaat cgcacccca	13860
cccgacgcaa ccagctccca caactcctcc ggcgaacaca cccacccgg aaaacgacac	13920
gccatcccca caatcgcaat cggctcatcc gcggcaacct gatgaagtgc gacctgcgat	13980
ggcgtctcgc cttccgcgtc gtcgcccac agctcacgac gtaggtgacg cggcagggtc	14040
gctgcattcg gctggtcgaa gaccagactg gtcggcagtc gcagtcccgt tgcctcacc	14100
aggcggttac ggagttccac cgctgtcaag gagtcgaagc ctaggctcgcg gaacgcgag	14160
tcaacgggga tcatctccgg cgcgttgttg ccgaggacgg tggcgatgtg ggagcggacc	14220
aggcgagga ggggtgtgtg ctgttgttcg tgtgtctggc cggccagccg ggcagtcagc	14280
tgggcgccgt tgtccgcacc accggtagtg gtggtgcggg tgggtgcggcg gcgggtggcg	14340
ggcaggaggt cctgcagcag gggcggcagg ggcggggcg gacgcaggtc ggcgggcagc	14400
aggaccggcc ggtccagagc cagggccgca tcgaagagag ccagtgcgtc cggggtcgac	14460
atgggatgca gaccggaacg gatgatgcgc cgggtggtcg tgccggccag gtgcccggtc	14520
atcccgctgg cctcttccca cagccccac gccagcgaca ccccgggcag acccgccgcc	14580
cgcgcgcggg acgccagcgc gtccagagcg gcattggccg cggcgtagtt gccctgccc	14640
gccgacccca ggatccccgc ggccgaggag aacagcacga acgccgacag ctccatacc	14700
cgcgtcagct catccagcaa aagagcggca tccaccttg cgcgaacac cgtgcccagc	14760
cgtcggggcg tgagagagcg gatcgtcgca tcgtccagca caccagccgc atgcacgaca	14820
cccgtcagcg gacaccggc aggaacaccc tccagcagcc ggaccacctc ccgcccgtcc	14880
cccacatcac acgcaacaat ccgcacctcc gcccccaacg cggccagctc cggccgcaaa	14940
ccctccgcac ccggagcatc cggaccacgc cggctacca acaacagatc ccgcacccca	15000
cacacaccag ccagatgccg cgccaccgcc gcaccagca caccgctcc acccgtcacc	15060
aacaccgacc caccgacaa ccacggcaac acctcccgac ccgatacatc aaccggcgac	15120
tcaagtcgtg tcaggcgtgc ggccagcacc cgctcaccac gcaccgcaa ctgcggtca	15180
ccacacgcca ccaccgacg cacacgcccc ccatccagac cagaccccat accggcctcg	15240
ttgccggcat cggcgtcagc gccgctgtcg aggtcggtgt ccaggtcgag gaggacaaac	15300

cggtccggat gctcagcctg cgccgaccgc accagccccc acaccgccgc acccaccaca 15360
tccaccgggc cgtcctccgg gccggccacc accgcacccc gggtcaccac caccagccgc 15420
gaaccgcaa accgctccag ccccgccac ccctgcacca caccacaacac cccaccaaca 15480
acctaccca caccaccgcc accgccgcca tcggcaccgg catccgggca ccgcaacacc 15540
accacccccg gcacaggccc accaccgctc tcacccacgt cctcgtgcca cgcccacgcc 15600
tgcccacaca ccggcacagg acccacctca gcccaactgca ccgcatacag cgaacccgcg 15660
cgccccggcg aaaccgagac agcacgcaac tgacctatat ccacaggccg caactcaaga 15720
cgatcgaccg acgccaccgg caccocgggtg tcgtcgtgta tgcgcacgca cacggccgcc 15780
cctgtcgctc caagcgctga caggcacgcg cgacaggaga ctgcaccatg cgtacggaac 15840
cgcagaccgt tccacacatg gggcacgacg ggcgtccccg gaccgcgcac agaaagcagg 15900
ccggtgccct gaagggcagc gtcgagcagg gccgggtgca gaccgtacgc cgccgcgtct 15960
cccgcactt cttcggaag acgtgcctcg acgaggatgt cgtcgccgta gcgccaggcc 16020
gcgcgcaacc cttggaatgc caggccataa gcaaagccgg cgtcgggcat ttgatcgtaa 16080
gccgtgttca ggtcgacagg cgtagctcca accggaggcc aggggtcccgc aagcagctcg 16140
tacgaggcag tgtcatcgtc cttggcaggg ctcagcacac ccgcggcatg acgcgtccac 16200
gcactggccg acgcacggc tccaccactg ccgcctcac cgctgagtg gatggtcac 16260
atgcggcgac ccgactcgtc cggcgccgca atggcaacct gaagggtcac gtctccgacc 16320
tcaggaatga ccaacggtgt gtggagcgtc agctcgtcca cgtggtcgca acccacactt 16380
tctccggcat gaagggccag ttccgcgaag gccgtacccg gcagcagcac gacaccgcct 16440
accgcatggc cggcgagcca gggatgcgtg cgcaacgaga ggcgccccgt cagtaggcag 16500
ccgtcccctt cggccagttc caatgtggcg ccgagtaggg ggtgttcggt ggggtcgagt 16560
ccggctgctg acacgttgcc ggcaccgggc tgtgtgcttt cgagccagta gtggtggtgt 16620
tggaaggggt aggtggggag gtcgaggtgg gtgtgggtgt ggggttggtt gtggtggtgg 16680
gtgtagtgggt ggggggtgcca ggtggtggtg gttttggcga ggttggtgag gaggtgggtt 16740
tgggggtggt ggtgggggtg ggtgaggggt aggggtggtg tgggggtggt ggggaggttg 16800
tggtggtgta ggggtggtgag ggtgttgtcg ggtccgagtt cgatgtaggt ggtgacgccg 16860
tgttggtgga ggggttggtt ggtggtggct atgtcgacgg tgttgccggc ttgttggttc 16920
cagtagtggg gggtaggag ttggtcgggt ggggtgttg cggtgatgag gggggtgtgg 16980
ggtgggtggt aggtgagggt ttgggtgtgc tgggtgagtt ggttgaggat ggggttggtg 17040
tggggggagt ggaaggcgtg gttggtgggg aggggttttg ttttgatgcc ttgttggttg 17100
cagaggggtg tgatgtgttg gacggtgtgg ggggtgccgc tgatgacgag ggaggtgggg 17160
gtgttgatgg cggcgatggc gaggtcggtt tcgtgggcgg tgatgtggtg ggtgatgtgg 17220
tggggggtg tgtggagggt ggtcatggtg ccggggggca tggtttgcac gaggggtggcg 17280
cgttggtgta tgagggtggt ggcgtcgggt aggggtgagga tgccggcgag gtgggcggcg 17340
gtgatttcgc cgagggagtg tccggcgtag tagtgggggg tgatgtggtg gccgtcgggtg 17400
aggaggcggt ggagggcgac ctggaaggcg aagaggcggt gctgggcgta cggggtctgc 17460

tggagcagtg	cggccgcttc	ttcgaggggtg	gtggtgtcct	gggtgttggg	gtcctgggtg	17520
aggaggggga	ggaggggggtg	gtcagaggtgg	gggtcgaggt	gggtgcagat	gtcgttgagt	17580
gcggcgccga	agacgggggtg	ggtgtggtag	aggccgtggg	ccatgccggg	gcgttgggtg	17640
ccctgtccgg	agcagatgaa	tgcgggtcttt	cctgcggcct	ccccggtoce	ggtcccgct	17700
ggggcgctgc	tgtggatgac	ggcgggggtg	ggttcgcctg	cggcgagtg	ctggagtgt	17760
tgcaggaagg	tgtcgcggtc	ggcggcgatg	agggtggcgc	ggtggtcgaa	cacggcgagg	17820
gcgtgggcga	gggtgtatcc	gacgtcggcg	agggtcgagg	cggggtggtc	ggtgaggtgg	17880
gcgtgcaggg	cctgggcctg	ggcgcgagg	gccggctgcg	acttggccga	caccagccac	17940
ggccacaccc	ctggactgcc	ggcagcagcc	tcctcgccac	taccggcatc	ctcgccggcg	18000
ggtgtccccc	cgggaacgtc	gtcggcggggt	gtgtctgacg	ggatgttgtg	ggcggtgtgt	18060
tcttcgagga	tgacgtgggc	gttgggtgccg	ctgacgccga	atgatgacac	tcctgcccgc	18120
cgtagccgcc	cctccccgcc	gggccagggc	accgtctccg	tcagcagctg	caccgcaccc	18180
gcggaccagt	ccacatgcgg	cgacgggtca	tccacatgca	acgtccgcgg	cagcagacca	18240
ttccgcagcg	ccatcaccat	cttgatcacc	ccggcgacgc	ccgcggcagc	ctgtgtgtga	18300
ccgacattgg	acttgaccga	gcccagccac	agcggccccc	cgccggcagc	gtcctgcccg	18360
taggtcgcaa	ggagggcctg	ggcctcgatc	gggtcgccca	aagtgggtgcc	ggtgccgtgg	18420
gcctccaccg	catcgacatc	accggccgac	aagccggcgt	tggcgagggc	ctggcggtatg	18480
acacgtgtgt	gggagggccc	gttggggcg	gtcagcccgt	tgctcgacac	gtcctggttg	18540
accgcactgc	cacgcaccac	ggccaggaca	cggtgaccgt	tgcgacgggc	gtcggagagc	18600
cgctccacca	gcagcatccc	cacaccctca	ccccagccgg	tcccgtccgc	cgccgccgag	18660
aacgccttgc	aatgcccgtc	cgcgccagga	ccccgtgcc	gcgaaaactc	cacgaaggca	18720
cccggagacg	acatcacccgt	cacacccccg	gcaagcgcca	tcgagcactc	acccgcacgc	18780
aacgcctgac	aggccagatg	taaagccacc	aacgacgagg	aacaagccgt	gtccaccgac	18840
accgcaggac	cctcaaaacc	aaacgtgtac	gagatacgac	cggaggccac	actcccggat	18900
gtgccgggtca	ggacatagcc	ctcgggtgtg	gctgcgccgt	tttcgtgcag	cctgggtcca	18960
taggcctgcg	gaatgaggcc	cgcgaaacag	cctgtctggc	tcccgcgtac	ggtcgtaggg	19020
tcaatacctg	cctgtcccat	ggcctcccat	gaggcctcca	gcagcaatcg	ctgtgtcggg	19080
tccatcgcca	gtgcctcagc	cggactgatc	ccgaagaagc	cggcgtcgaa	ctcccccgcg	19140
tcgtagagga	aactcccaca	gcgggtgtac	gaggtgcccg	gccgaccggg	ttccggatcg	19200
aacagtgttt	ccagggtccca	cccacgggtc	gtcggaaaact	cggcgaccgt	gtccctcccc	19260
gatgcgagca	gttcccacag	ctcctcggtg	gaggtgacgc	ctccgggata	gcggcacgcc	19320
atgccaatga	tcgcgacggg	ctcgtcctgg	tctgcaggca	cagccgcagc	acggggagct	19380
gggatggagg	cagtgtgtgc	cgagcccaga	agttgtgtgt	ggaggtgggtg	ggtgaggggtg	19440
gtgggggttg	ggtggtcgaa	ggcgaggggtg	gtggggaggc	ggagtccggg	ggtgccccgag	19500
agccgggttc	gtagttcgac	ggcggtgagg	gagtcgaagc	caggttcgcg	gaacgcggcg	19560
tcggggggga	tggtgtcggg	ggtggtgtgg	ccgaggacgg	tggcgatgtg	ggagcggacc	19620

agggcgagga ggggtggtgtg ctgttggttcg tgtgtctggc cggccagccg ggcagtcagc	19680
tgggcgccgt tgtccgcacc accggtagtgt gtggtgcggg tgggtgcggc ggggtggcg	19740
ggcaggaggt cctgcagcag gggcggcagg ggcggggcgg gacgcaggtc ggcgggcagc	19800
aggaccggcc ggtccagagc caggggccgca tcgaagagag ccagtgcgtc cggggtcgac	19860
atgggatgca gaccggaacg gatgatgcgc cggtggtcgg tgcgggccag gtgcccggtc	19920
atcccgtgtg cctcttccca cagccccac gccagcgaca cccccggcag acccgccgcc	19980
cgccgccggt acgccagcgc gtccagagcg gcattggccg cggcgtagtt gccctgcccg	20040
gccgacccca ggatccccgc ggccgaggag aacagcacga acgccgacag ctccataccc	20100
cgcgtcagct catccagcaa aagagcggca tccaccttgg ccgcgaacac cgtgcccagc	20160
cgctcggggc tgagagaggc gatcgtcgca tcgtccagca caccagccgc atgcacgaca	20220
cccgtcagcg gacaccggc aggaacaccc tccagcagcc ggaccacctc ccgcccgtcc	20280
cccacatcac acgcaacaat ccgcacctcc gcccccaacg cggccagctc cgcccgcaaa	20340
ccctccgcac ccggagcatc cggaccacgc cggctcacca acagcagatc ccgcacccca	20400
cacacaccag ccagatgccg cgccaccgcc gcaccagca caccggtccc accggtcacc	20460
aacaccgacc cacccgacaa ccacggcaac acctcccgac cagcaacatc accggaccgc	20520
tgagcaggta catcaacgga cgactcaagt cgcgtcaggc gtgcggccag caccggtca	20580
ccacgcaccg ccaactgcgg ctccaccac gccaccaccg ccgccacatg cccaccatcc	20640
acgccccaac cagcaccagc accagcacca gcaccggtgt cgaggtcggg gccgggtgtg	20700
gtgtcgggtg cgaggtcgag gaggacaaac cgggtccggat gctcagcctg cgccgaccgc	20760
accagcccc acaccgccgc acccaccaca tccaccgggc cgtcttcttg gccggccacc	20820
accgcacccc ggggtaccac caccagccgc gaaccgcaa accggtccag cccagccac	20880
ccctgcacca caccacac ccaccaaca acctcaccca caccaccgcc accgcgccca	20940
ccggcaccgg catccgggca ccgcaacacc accacccccg gcacaggccc accaccgctc	21000
tcaccacagt cctcgtgcca cgcccacgcc tgcccacaca ccggcacagg acccacctca	21060
gcccactgca ccgcatacag cgaacccgc cgccccggcg aaaccgagac agcacgcaac	21120
tgaccatat ccacaggccg caactcaaga cgatcgaccg acgccaccgg cacaccgcc	21180
tcatccccga ccacgaccga caccgctca cgcccgccgc ccgcccctac agcccacaca	21240
cgcaccgcga caccggtcac acccgccggg tgaagcgaca caccaccca cacagccggc	21300
accggaacac cctccccgaa ccccgcccc tccccaaacc ccgtcccacc cggaagcaac	21360
accgacaacg gctggaccac accatccagc aacgcgggat gcagcccaaa accagccgca	21420
tcaccccacg cctcctccgg cagacacacc tcagccagca aatccccccc atcacgccac	21480
accgcacgca gccccgaaaa caccggcccc aaaacacaac cagccccagc caaacgggtca	21540
cggacaccat cgacatccac cgccaccgca ccccgcgggg gccacacccc cgccagacca	21600
tccaccacca caccaccacc agcagcagcc tcaaccagca cccccaggc atgacacgtc	21660
cacacccac ccgacgcacc acccccacca caagcactcc caccocgcgc atacacactc	21720
accaaacgcc gcccctcccc atccgcagcc gcaaccccaa cctgcacact cacaccccca	21780

cccacaggaa ccaccagcgg cgcattgcaca gtgagttgct cgattcgggt gcagcccacg	21840
cgttcgccaa cctggaccgc cagctccacg aacgccgacc ccgacagcag gaccgcaccc	21900
cccacctcgt aatcgcccag ccacggatgc gagcgcgaagg acaggcgacc cgtcagtagg	21960
cagccgtccg tgtctgcgag ttggactgtt gccgcgagca gaggggtgtc ggccggctcc	22020
aagccagcag cggcgacgtc acctgctccc gtgggagcgt cgagccagta gtgctggcgt	22080
tggaagggat aagtggggag gtcgaggtgg tggttgtggg ggtgggtgtg gtgggtgggtg	22140
tagtggtggt gccaggtggt ggggtgtgcc atgccggtgg tgtgggtgtg ggcgagggcg	22200
gtgaggaagc ggcgggtgtc gttgtcgccg cggcggaggc tgccgatcgc ggtgacgtct	22260
tcggcgggtgt cttcgggtggt gtcttcgatg gcggggacga ggggtgggtg ggggctgact	22320
tcgacgaaga cgcggtgtcc gtcatccgcc agggcctgga cggcatcgct gaaacggaca	22380
ggctggtgca ggttcggta ccagtaggcg gcgtccaggg ttgtggtgtc cagccagggtg	22440
ccctccaccg tggagaagaa cggcacgccg gacggctgcg ggctgatgtc ccccagcagc	22500
tccagcaact cctcccgcag gggctgcaca tgggggcagt gcgaggcata gtcgaccggg	22560
atccgcgggg cccgcacccc ggtgccggca cagtacgcc aacacctcgc caccgcctcg	22620
gcattccccg agacggcgggt ggagcggggg ccgttgaccg ccgccacca caaccgcccc	22680
gcccaccgct caccaatgag ctgctccacc tcctgggcag gcagcggcac tgaggccatg	22740
ccgccccggc cccgcacagc ggccagcgcc cggctgcgca gcgcaacagt cttcgccgcg	22800
tccttcaggc tcagcgcccc acacacatgc gcggccgcga tctcgccctg ggaatggcca	22860
aggaccgcgt cgggttcgat accgtaggaa cgccacagag cagccaaaga caccatgacg	22920
ctgaacagca caggctggac cacatcgcc cgctcccaca ccgcattccc cgcgtcccg	22980
cgcaggatgt ccaccacaga ccagtccacc cagggcgcca gagcctcctc gcacgcctgc	23040
atccgcgggg cgaacaccgg agaggaggcg agcagacgca caccatccc ggccactgc	23100
ccacctgtc cgggaaacac gaagacgaca ccgccccggt caccacccgg cgcattgacc	23160
gtggtcaccc gccgatccgg ctcacccgcc gccagcgccc ccaaccctg caccagctcc	23220
tcacgggtccg cggccaggac gaccgcacga tgctccagca cagcccgccc acaggccaga	23280
ccgcaccca catcggaag cgaaacgtcc ggccggactg ccacgtactg acgcaacgcc	23340
tccgcctgcg cccgcaacct agcctcagac ctagccgaca ccggcacagg aaccggcacc	23400
ggcaccggca ccggcaccga ctcagccacc ggcgcagaca cagccactgg agcggccacc	23460
gactcagcca ccgaaatggc aagaccggga gcaccctcca acaccccacc cccggcaaca	23520
cagccccccg ccgcggcgcc ctcctccaaa atcacatgcg cattcgtgcc actgaccccg	23580
aacgacgaca ctcccggccg ccgcaaccgc cctgccggt cccccggcca cggcaccgcc	23640
tccgtcagca gccgcaccgc ccccgggac cagtccacct gcggcgacgg ctcattccaca	23700
tgcaacgtcc gcggcaacac cccctcccgc aacgccatca ccatcttgat gacccaccc	23760
acacccgcgg cagcctgcgc atggccgatg ttcgacttca ccgatcccag ccacagcggc	23820
ctgttacccg cccgctgccc gtacgtggcg agcaacgcct gcgcctcgat cggatcacc	23880
agcgtcgtgc ccgtcccatg cccctccacc acatccacat ccgccacgga caaccccgcg	23940

ttcgccaacg cctgccggat caccgcctcc tgagccggac cattcggcgc cgtcaaccca	24000
ttcgacgcac cgtcctgatt gaccgcactg ccgcgcagca ccgccagcac ccgatgcccc	24060
agccgcaccg catccgacaa ccgctccacc aacagcatcc cgacgcccctc gcccatgccg	24120
gtgccgtcgg ctccaccgcg gaaggacttg cagcggccgt ccaccgacag tccgcgtgg	24180
cgtgagaact cgacgaagag gtgcggggtc gacatcaccg tcacaccgcc ggccagcgcg	24240
agcgtgcact caccgcaccg cagcgactgg cacgccagat gcagcgccac caacgacgac	24300
gaacatgccg tgtccaccga gacggcaggg ccctcgagac cgagcgtgta ggcgacgcgg	24360
cccgcgcga cggcgccgcc gctaccgttg ccgatgtagc cctcgaatcc ctcggggatg	24420
gtaccagggc gggatccgta gtcgtggtac atcaccgccg cgaagacacc cgtacgggag	24480
ccacgcacgc acagcggatc gataccgcc cgcctgaacg cctcccacga cgtctccagc	24540
aacaaccgct gctgcggatc catcgccaac gcctcacgcg gactgatccc gaagaagtcc	24600
gcacgaact ccccgccctc atacaaaaac ccgccatacc gcgcgtacga cgtccccgac	24660
cggtcagggc ccgaatcaaa caaccctcc agatcccacc cccgaccggc cggaaattca	24720
ccaatcgcat cccacccga cgcaaccagc tcccacaact cctccggcga acacacccca	24780
cccggaacac gacacgccat ccccaacaat gcaatcggct cgctggacgc ctccatggcg	24840
gctgccagtt gctcattacg tgcccgcagg gtctggttcg ccttcagaga cgccctaagc	24900
gcgtcgacga gcttttcgct ggacgtgtcc atcactgtct cccaaattca agaagtctca	24960
gaaaggcccg tatggccgta agggggaaag cactgatcga tgccggagcc gaccggatac	25020
caccgactgg ccgactggcc gaccggccga cggggctgtg cccgaccgc cgatcagggc	25080
cgcgatcagg accgcgatca gaggcgcgat cagcgccgca ctgatgcgat ttctgtcagc	25140
cattcgtcga catgccgagc agtcgaatcc gcaaactgtt ccagcatcgt gaagtgatc	25200
ccctggatgt ccagaacggt gtgcggaaact cccacggcg gcggcatctg ttctccgtcc	25260
cggccgcgca ggaagagggc ggggtgtggtg atgtccggag gactccagcc ggagaagatg	25320
cggaagtatc cgcccatggc gaccaggcgt gtgtagtcca cgtccacaaa ctgcgtgacg	25380
cggtcgaaga tttcacttgt cagcgcgga cgcacaggtg cgatgccgtc gtccgggaga	25440
taggcgtcca tggtcaccac cgcttcggga cggacgccta gacgtccag atgactcgtc	25500
accgcgtaga cgaaccatcc gcccgcgga tgcccgga gcgcaaaagg cgcgccgtcg	25560
gtgaaccgga cgatcgctc ggccaacatg cgggtcaccg cgccgattcc ggacggcagg	25620
ggttcgccct ccaggaaccc tggcgagga acgtaccaga cgtctcggtg tccgttcagt	25680
cccgccgca aacgtgagta ctggtacacg ctcgacacgg cggcgacggt gggcaggcag	25740
atgagggcgg gccgtgtttc gcccggggc agtgcttcac cttgggcgcg cgcttcaccc	25800
tgggcgagcc ggacgaacgt cggtccggg atgtccgagg ggtccgtgaa ggcgggcccg	25860
aagaaggagg ccgccgagag cagggccatg gactcctcga tgcggcgggt gtcgtgtccg	25920
atccagaaca gggattcgac ggtttcggtg gaggtgccgc ccctggctctg ctgcttctcg	25980
ctccccgtac tgcgtgctg tccggtctcg gactccctg cgctcccgcc cccggctgcc	26040
gcggcggcag ggcgggctc gtccggcgtg cccgcctcgg ccgtcaggcg ggtcgcgagg	26100

tgatcgccga gtgccgcggg gctgggctgg tcgaagatga gcggtgccgg gagggcgagg	26160
ccggtgacgg cgttgatccg gttgcggagt tcgacggcgg tcagcgagtc gaagccgagg	26220
tcgcggaaact cgggtgcggc cgggaccaga tcgtccggga gtgcgccgtc cgcggctgtg	26280
acggcgctgg tggggtgggc gaggacggcg gcggcatggg tccgtacgag ttccaggagg	26340
agaccggtgc gctgcgcggg gatggtgagt ccggccaggc gctcgcgcag cgtggcgggg	26400
gtgtcgggtcg cgatgccgtg gtcggcggac cgcggggccg ggatgcggtat cagcccggtc	26460
aggatgcgcg gcagggcggc ggccgtggcc tgtgcgtgga gggtagggcg gtcgagccgg	26520
gtggcgagga gcagcccgtc accgaaaggg ccgaggcgat ccgtgtgtc gaggagcgcg	26580
agtccctgtg cgttgacag ggggagcagg ccgcgcggg ccatgcgcgc gaagtccgtg	26640
ccggcgagggt tgcgggtcat gccgtcggc tcgccccaaa ggccccaggc gaggcgaccg	26700
cccggcagtg cctgggtgtg gcgggtgtgc atcaggggct ccagaaaggc gttcgcgcg	26760
gtgtagttgc cctgtccggg actgccgaag gaggcggcgg ccgaggagaa gacggtgaag	26820
gtggtgaggc cggcgtcgcg ggtcaggctc tgcagggtcg cggcgccga cgccttcgcg	26880
tgcaggacgg cctccatgcg ctccggagtg agcgagggtga ggatgccgtc gtcgaccaca	26940
ccggccgtgt ggatcacggc ttccaggggg tgcgcgcgg gcacttggtc gaggagcgcg	27000
gcgacggccg cccgggtccc gatgtgcgag gccgcgaccg tggcctcggc gccgagggcg	27060
gcgagttcgg cgaccaggtc ggcggcgcgg tccgcggccg tgccgcggcg ggtggccagc	27120
agcagggtgc gtaccccggt gcccggtggc agatgacggg cgacgagccg gccgaggacg	27180
ccggtaccgc ccgtgatgag gaccgtggc tccgggtccc agtcggcgtc ggtggtgtc	27240
ggctgtggct gccggacggg cactcgtgtc atccgcggga tgcggacggc accatttcgc	27300
agggcgatct gcggttcccc ggccagcagg ggaaggcgt tgcgggaggc gtcggtgtc	27360
tcggtgtcgg ccagcaggaa ccggtcgggg ttctcgtct gcacggagcg gaccagtccc	27420
cagacggcgg cgtgtgcgag gtcggacacg ggctcgtcgg gggtcgcggg gaccgagccg	27480
tgcgtgagga gggccaggcg gcaggcccg agccgttcgt cggcgacca ttccctggagc	27540
agggcgagga cgcgggtggt ggcttgccgg gtggcgtcgg cgagggcggg ggagtcggcc	27600
ggggccgagc cggccggggc ggaatcgggt agggcggaat cggtagggc ggaatcgggt	27660
ggggcggatg cggcgtccgg ctgcacgag atgacgacca tgcccgtgtc cggggcgccg	27720
gccgccaggg cttctgcgag agccgccggg tccgggtagg cctgccagga ggcgccgttg	27780
cgctccagga cggcggccgt ccgcccggca ccggggccga ttagggcca gtcggctgtc	27840
cgtgccggtg tggtagggag gtgcagcggc cgccattcga tgcggaagag gtggctcgtg	27900
tagccggtgc gcgcggcctg gagctgctcg gcggagacgg gccggaaggc gagggacccc	27960
gcggagatga cgatgcgtcc cgatgcgtcg gtggccagca gtccgaccgc gtcctcgtcc	28020
gtgcggacgg tgagacggac gtgcagggtg gaggcgccgg aggcggcgac cgtgacgccg	28080
gtccaggaga acggcagcca gccgtgtccg tcggcgggcg catcgccctc gtggcgcaga	28140
acgaccgggt gcagtgccgc gtccagcagg gccgggtgca gggcgtagcg ggcggcgctc	28200
gccgcctgtc cctccgtgt ctccggcagg gtgacgacgg cgaacacctc gtccccgcgc	28260

cgccagacct cgcgagcccc ctggaacacc ggcccgatat ccaggccggc gccggccagc	28320
tgctcgtacc agccgtccag gtccaccggt gctgcgtcgg cgggcggcca cggttcctgt	28380
gtgtgctcct ccgcgggccg ggcggtgccg gtcaggacgc cggtagcggtg gcagggtccac	28440
tcggtgccgg tcgccgccgc ggacgaggac gacagtccgt cgtcttcgcg ggcgtacagg	28500
gcgaagggtgc gccgttcggg ctccctcgggc gtctgggggc cctgggggtgc cccgacggag	28560
agttgcagga tcaccgagcc ctgttcggga aggacgagcg gtgtccgcag ggtgagttcc	28620
tcgacgggtgc cgcagtcgac ctctctgcct gcgcgcacgg ccagttccag gatggccgtg	28680
ccgggcagca ggacgggtacc gaagatggcg tggtcggcca gccacgggtg tgtgcgcagg	28740
gagagacggc cggtagagag gaggctctgc gactcggcca gtgccaccgc ggaaccgagc	28800
aggggatgcc cggcggtgcc gagccccgt gccgacaggt ccccggggtg gccggccgag	28860
gtgtcgaccc agtagcgggtg gtgatcgaag gcgtaggctg gcaggctcag gtggcgggct	28920
cgatcgcgtt cgggcagggc ggcggggccag ttgaccgccg ccgctccgtg cgtatgcagc	28980
cgggccaagc cggtagagcag ggtgccgggt tccgggctgt cgggccgtag gagcgggatg	29040
agcaggttct cttgcggggt gccgggtgctg tcgtcggcgg ggtggctgtc ggcgggtggc	29100
tctaggcatt cctcgccag tgccgacagg gtcccgtctg ggcccagttc catgaagggtg	29160
cggactccgt cgggtgtcag gcggctgatc gcgtcgccga agcgcacggt ccgcctacc	29220
tgccggaccc agtactcggg gtcgctcagt tctcccgcg ccacgatgtc gccggtgagc	29280
gtcgacacca tgggaatggc tggttcgctg taggtcagcg aggcgcgcac ctgctggaac	29340
tcctccagca tcgggtccat cagcgggtgag tgggaaggcat gcccggttcg caggcgcttg	29400
actctccgcc cgcgctcggc gaaccagtcc gccatgttcc ccacctcgtc ctcggcgcg	29460
gagaacacca ccgagggcggg tccgttcacg gccgcgaccg acaccggggc ttcccgccg	29520
tcgagcgcct gtcgcgcctc ggcttcgctc gcccgtagcg cgacctggc gccgcctggt	29580
gcgagctgct ccatcaggcg ccgcggggc gccaccaggc ggcaggctgc tgccagggga	29640
agcaccgccg cgacgtgggc ggccgcgagc tcgccgatcg agtgcccggc cacgaagtcc	29700
gcgcgcacgc cgagacgttc cagggtgccg aagagcgca cctggacggc gaacagcgcc	29760
ggctgggcgt acccggtacg gtccagaaca tccgcggcat ccgcgacatc cgcaagatcc	29820
gcactggcgt ggatcagcgg gcgcaggggc tggccagggt gaccgtccag ttccgccagt	29880
acctggtcca gcgcgtccgc gtagggcggg tgagccgcat acagctgacg gccattccc	29940
acgcgttgcg tgccctgtcc ggcgaaacagc atggcggtct ttccgcgcg gcggcctgag	30000
tggccgccac gggggccgac cgaccttcg atcaggccgt ccgccgaccg gccctcggcc	30060
agcgcgtcga gggcctgaag gaagccgtcg cggtcctcgg ccacgacgac ggcccggtga	30120
tcgaacacgg accgctgtgc cgccagggcg tgcgccacgt cggccggccg ggcacggat	30180
gccctggcag cgaactgccg caaccgtcgc gcctggcccc gcagcgctcg ctcggaactg	30240
gcggagagca gccacgggat gggcaggagg gccggcttgt cggacatggc gtcggcgacg	30300
cactccggtt cagccgactt gtcggacacg gcctcggcga cgactcagc cgacatctcg	30360
gacatggcgt cggcgacgca ctccggttca gccgacatct cggtcacggc gtcagcgacg	30420

cactccgggt cagccgcctc ctcttgccgc tcggtgaggt ccgccgggtcc ggtggcgctcg	30480
accacgtggg ggcctcgcac cggcgctgc tcgacgatga cgtgcgcctc agccgggtacc	30540
ggctcactga tgactgcgc ctcgaccggc gcctgctcga tgatgacgtg ggcgttggtc	30600
ccgctgactc cgaacgcgga gacgcccgcg cgcctgggccc ggcggttctg ctgccacgggt	30660
acgggctcgg tgagaagccg gacgcccgcg ctcgaccagt cgatgtgggg ggagggttcg	30720
tcgatgtgca ggctggctcg caacagttcg tggttcaggg ccatgaccat cttgatcaca	30780
ccggccacac ccgcggcagc ctgcgcctgc ccgatgttcg acttcaccga ccccaaccac	30840
accggccgct ccccgaaacg accctgcccg tacgtggcga gcaacgcctg cgcctcgatc	30900
ggatcaccca acgtcgtacc cgtcccgtgc ccctccacca catccacatc cgccacggac	30960
aaccccgcac acgccaacgc ctgccgaatc acccgctgct gcgacggacc attcggcgcc	31020
gtcaacccat tcgacgcacc gtccctgattc accgcactcc cccgcaccac cgccaaaacc	31080
cgatgaccac gacgttcagc ctcggacagc cgtccacca acagcacacc cacaccctcg	31140
gcccagccga ccccatcggc ccccgaccgg tacgccttgc accggccgctc cggcgacaga	31200
ccccgctgcc gcgagaactc cacaaacgca cccggcgctg acatcacctg cacaccccc	31260
gccaacgcca gogaacactc ccccgacctc aacgcctgac acgccagatg cagcgccacc	31320
aacgacgacg aacacgccgt atccaccgtc accgcgggac cctcgaagcc gaagggtgtag	31380
gaaagccgcc cggagacgac gctgttgagg acgcccgtga gcgcgtacc ctcgtggtcc	31440
tgggtgccgc ggcgcaggag ctcggcgtag tcctgctgcg agacgccggc gaagacaccg	31500
gtcgtggacc cgtgcagcgt ggcggggctg atgcccggc gtcccaacgc ctcccaggac	31560
acctccagca tcaaccgctg ctgcggatcc atcgccaacg cctcacggcg actgatcccg	31620
aaaaaccccc catcgaactc cgccgcaccc tgcaaaaacc caccacaccg cgtgtaggac	31680
gtacccggcc gccccggctc cggatcatag aaagcctcca cgtcccaacc ccggctgacc	31740
ggaaactccc ccaccgcac cgcacccgac gcgatcaact ccagaaaatc ctccgcccac	31800
tccacacccc ccggaaaacg gcacgccatc cccacaatgg caatcggctc gtcgacatcc	31860
acacgcggtg ccggggcccg aagggcaagg gcaagggcag tgccgggtgt cgggcttccg	31920
ccgctcagct gctcgtggat gtgtgccgcg agtgccaccg ggcggggatg gtcgaacacc	31980
agggctcctg ggaagcgcag gcccggtggc gtgttgaggc ggttgctgag ttcgacggcg	32040
gtgagggagt cgaaccgcag gtcgcggaag gcgcgctcgg gcaccaccgc atcggcggtg	32100
ccgtgtccaa ggacggccgc ggcattgggt aggaccaggt ccagcacggt ctcggcctgt	32160
gcggcggggt cgagtccggc gaggcagtcg cgcagcatgc cgccgcgcac ggtgtccacc	32220
gcctccgaca actgaccacc ccaactgccca gagaccccg gaccccgcg gcccccctcc	32280
acatccagcc aaaagcgctc tcgctcgaac gcatacgtc gcagctccac cccgcaacca	32340
ccagcgaccc cgcgaccaac actcccgaac acaccggacc actcaaccgc caccacaccc	32400
acgaacaact cggccacgga catcaggaag cgtcgaagc cgccttcgcc ccggcgacga	32460
gatccgacga ccaggctgtc caagtcaccc atctcgtcca gggtttctg cacaccgacc	32520
gcgacggccg gatgcgggca cgcctcgatg aagacggtgt ggccggcgcg gaccagcgcc	32580

tgtgtcgcgt cccggaagcg gacgacctgg cgcagggtgc ggtaccagta gtcggcgctcg	32640
agttcgggtgc cgtcgatgcg ttccgcggtg acgggtggagt agaagggcac gtcgcccgttc	32700
ctcgcgcgga tgggggagag gagttcgagc agccgccctt ggatcgccctc gacctgcggg	32760
gagtgcgacg cccagtcgac catgagcctg cgggcccgtta cgtcttcgtg tgacagctcc	32820
tccaccaggg cgtcgaccgc ttccggctcc ccggagacca cggccgaacg cggcccgttc	32880
acggcggcgga tgaccagacg gtcgccccat gtcgcaagac gcggctccag cttctcgacc	32940
ggcagaccga ccgatgccat cggccccctgc ccggccagtg cggccagcgc ctggctgcgc	33000
agggcggtga cccggggcgc gtcgtcgagg gagagtgcac cggcgacgta ggccgctgcg	33060
atctcgccct gcgagtgcc ggccaccgcg tccgggtgta caccgtacga gcgccagagc	33120
gcgccagcg agaccatcac cgcgaagagg acgggctgga cgacatcgac gcgttgacga	33180
gggggtgcgt ccggtgcgcc gcgcaggacg tcgaggagag accagtccag gtacggttcg	33240
agggcttggg cgcagtcgga catctgctgg gcgaagaccg gtgaggagcc gaggagtcc	33300
tgcccatgc cttcccagtg ggtgccctgt cctccgaaca gcatggcgat ctttcctgcg	33360
gcgcgcggtc cggccacacc ctgtaccacc cccgcggtgg gtgccccctc ggccagtgcg	33420
tcgagtgcgt gcaggaactc gtcgcggtcc tcggccacga ccaccgcacg atgctcgaac	33480
accgaccgct ccgacaccaa agcccgcgcg accccagccg gactcacccc cacaccatcc	33540
gcacccccac caaccgccac aaccccacgc aaccgacgcg cctgcccccg caacgccaac	33600
tccgaccgcg ccgacaccac ccacggcacc acccccgaac ccgacaccac ccccggaacc	33660
aactcctgca gccggccgcg acccccaccc gcgcccccg agcctcctc caaaatcaca	33720
tgcgcatteg tcccactcac cccgaacgca gacacccccg cagcgcgag ccgaccctcc	33780
acccccggcc actccacctc atccgccaac acacgaaccg acccactcga ccaatccacc	33840
tgcgacgacg gctcatccac atgcaacgtc cgcgggaaca cccccgcgcg caacgccatc	33900
accatcttga tcacaccgc caccaccgca gcagcctgcg catgcccgat gttcgacttc	33960
accgacccca accacaccgg ccgctcccc gaacgaccct gcccataagt ggcgagcaac	34020
gcctgcgcct cgatcggatc acccaacgtc gtaccctgct cgtgccccct caccacatcc	34080
acatccgcca cggacaaccc cgcacacgcc aacgcctgcc gaatcaccgg ctgtgcgac	34140
ggaccattcg gcgccgtcaa cccattcgac gcaccgtcct gattcaccgc actccccgc	34200
accaccgcca aaaccgatg accacgacgt tcagcctcgg acagccgctc caccaacagc	34260
acaccacac cctcggccca gcgacccca tcggcccccg acccgtagcg cttgcaccgg	34320
ccgtccggcg acagaccccg ctgcgcgag aactccacaa acgcacccgg cgtcgacatc	34380
accgtcacac cccccgcaa cgcacgcgaa cactcccccg acctcaacgc ctgacacgcc	34440
agatgcagcg ccaccaacga cgacgaacac gccgtatcca ccgtcacgc cggaccctcg	34500
agccccaggg tgtaggcgac gcgtccggat gtgacgctgc tggacaggcc cgtcatggcg	34560
tagccctcga ggtcctcggg ggcccggcgc acgaggctcg cgtagtcctg actgcacatg	34620
ccggcgaaga caccggtcgt ggaccgcgc aacgtggcgg ggtcgatgcc cggccgctcc	34680
aacgcctccc aggacacctc cagcatcaac cgctgctgcg gatccatcgc caacgcctca	34740

cgcggaactga tcccgaaaaa ccccgcatcg aactccgccg caccctccag gaaaccgccc	34800
cgcgcggtat acgacgaacc cgcccgcccc ggctccggat catagaaagc ctccacgtcc	34860
caaccccggt cgaccggaaa ctctcccacc gcatcccgac ccgacgcgac cagttcccac	34920
aagtccctcg ccgactccac accccccgga aaacggcacg ccatcccccac aatcgcaatc	34980
ggctcgtaa cgtcgacacg cgacgccggg accggaggag caatgtcacg ctggccgccc	35040
gcgccctcct ccagctgttc cttgaggtat ccggccagcg cggaggaggat ggggtagtcg	35100
aagatcagcg tgggtggcag gaggagcccc gtgacggcgt tgaggcggtt gcgcagttcg	35160
acggcgctca cggagacgaa gccaggtcg cggaaggctc gtcaggggcg tacggcggtg	35220
ggggtgctgt gtccgagcac ggtcgccgcg tacgtacgga ccaggtcgag aagcgcacgt	35280
tcctgctcgg cgggtgtccat ggccttgagc cgtgcggaga acgagtcggg ggatgcggtg	35340
ggggtgtcga gtccggtggt ttcccgggcg aggcgtgctt cggggatgtc gctgatgagg	35400
ggcgagagtc gggagccggg gaggaggttg gcggtgaatc ggtcccagtc gatgtcggcg	35460
accgtcacac aggtctcgtc atggtccaac gcctggccca gtgccaccag cgccgtctcc	35520
ggcgatcatg ccgccagacc ccgacgcgcg atctgccccg cggcccccctc cgccatcccc	35580
ccaccagccc acggacccca cgccaccgcc aaccccgga ggcctcacc acgccggtgc	35640
cgaacgattg cctccacata cgcgttcgcc gccgcgtaac tcccctgtcc cgccggcccg	35700
aacgtcgccg cagccgacga gaacaccacg aaccccgaaa gatccgcccc ccgctcaac	35760
tcatgcagat tccaggccgc cagcgccctc gccgcagca ccccggtgac acgctcggac	35820
gacaaccctt ccaacacccc gtcatccaca actcccgcg catgcaccac cacaccacgc	35880
gggcactccg ccggaacggc cgaccgcaac acctccgcca acgcctcacg gtccgcccga	35940
tcacacgcca ccaccgacac ccgcgcgccc aagcccatca agtccgctcg gagttcttcg	36000
actccctggg cgctctcccc gcgtcggtc accagcagca ggtgttcggc gccacgcggg	36060
gccatccacc gggcgacgtg cgcacccaac tcgccggtgc ctccggtgac gagtacggtg	36120
ccgcggggcc gccactcccg ctccgcgacg gcctcctcca acggcgcccc caccaaccgc	36180
cgcacaaacg ccccggaaga ccgcacggca aactcactct caccctctcc cccacacccc	36240
gccagcacac ctaccaaccc atcgaccacc cgctcatcca cgagctccgg cacatcaacc	36300
agccaccccc agcgggtccg tgctccgcc ccaccacac ggcccagccc ccacaccaca	36360
cccagggccg gccccacac agcatcccg cccccaccg acacggcccc gcccgtcaca	36420
caccacagcc gcgccccac gccacatca ccagcgcct gcaccaaccc cacagacgcc	36480
actccgcct gcacgacgcc actccccag ccacaaggg agacgacacc gccgacagcc	36540
tcaccatcga ccgcctcacg caggtggccg gccaacactt ccctgctcac acaccccgct	36600
tcacactcca cccgaaccac tcgcgcccc caccgtcca accctccgc caccacatca	36660
accgggcccc cctcgccctc ggacaccacc agccacgcgc ccgacagccc ccctacacca	36720
ccgcccgaag cgggtcgcca cactcccg tagcgccacc cgtccaccac ttcacgctcg	36780
tgccgtaccc gccccattc cccaacgcc gacaccaccg caccagcga cgccccctca	36840
tccaccccaa ggagcgatgc caccaccccc gcatcaccac actcgaccgc ctcccacaac	36900

ggaccacccc acatcccggga aaccccggaa cctcccgcag atccctcctc cactgccage	36960
caaaatcgct cccgctcaaa cgcatacgtc ggcagctcca ccccgcatcc atcaccgacc	37020
tcgcgagcag tcccctcgaa cacaccggcc cactcaacgg ccgtcccagc cactgaacaac	37080
tccgccaggg cggatcatgac cgaccgtgcc tccggctggt ccggccgcag ggcggggatg	37140
gcgcggggccg gtgcactgag cgagtcctgt gcgagggccg acagcgtgcc gtcggggccg	37200
atttcgaggg aggtggtag gccctgttcc tgaagccatg agatgccgtc cgcgaaacgg	37260
accgtgctgc gggcggtgtc gaccagtag tccgggtgc acatgggtctc ggcggggagg	37320
ggcgcgccgg tgacgttga gacgacggga atcccgggg cgctgaagg gacctgctcg	37380
gccgcgcggc ggaagtgcg caacatggcg tccatgtgcg gcgagtggaa ggcgtggctg	37440
gtccgcagcc gccgggtgcg gcggcctcgt gccgccatt gctgcgcgag gtccaggacc	37500
gcgtcctcgt ccccgagag gacgatcgac cgcggccgt tcaccgggc gtgcgcgacc	37560
cgggatgcgt attcgtcggg cagcgggagg atctcgtcct cggacgcctc gatggccacc	37620
atggctccgc cggacgggag cccttgcatc aggcggcctc gtgcgaccac cagtgcacc	37680
gcgtcggcaa ggcagagcat cccggcgaca tggcgggccg ccagttcacc gacggaatgg	37740
ccgaggacgt agtcggggtg cagaccccag gtctccagca gccggaacag cgcacctcg	37800
aaggcgaaca gggcggggtg ggcgaaaccc gtgtcctoga tcagccggcc ttcgggagag	37860
tcctcggggtg cgaagagtac gtcccgcagc ccaggggcac cgggggtcgg ggcggcggtg	37920
tcggcctccg cgcagatctc gtcgatggc tgggcgaaga cggggtacgc ctctgacagt	37980
tcgcggccca tgcctgcgcg ctgggttccc tgcccgga agagtacggc gagttcggcc	38040
gagggtggtc gtccctcgac gacgccggc acggggcggc cgcggccag tgcgtcagat	38100
gcgtgcagga actcgtcgcg gtccctcgcc acgaccaccg cactgatgctc gaacaccgac	38160
cgctccgaca ccaaagcccc cccgacccca gccggactca cccccacacc atccgcacc	38220
ccaccaaccg ccacaacccc acgcaaccga cgcgcctgcc cccgcaacgc caactccgac	38280
cgcgcggaca ccaccacgg caccaccccc gaaccggaca ccacccccg acccaactcc	38340
tgcagccggc ccgcaccccc acccgcgccc cccgacgcct cctccaaaat cacatgcgca	38400
ttcgtcccac tcaccccgaa cgcagacacc cccgcacgcc gcagccgacc ctccaccccc	38460
ggccactcca cctcatccgc caacacacga accgaccac tcgaccaatc cacctgcgac	38520
gacggctcat ccacatgcaa cgtccgcggc aacaccccc cccgcaacgc catcaccatc	38580
ttgatcacac ccgccacacc cgcagcagcc tgcgcagtcc cgatgttcga cttcaccgac	38640
cccaaccaca cggcggtgtc accggccgcg tgcctgtacg tggcgagcaa cgcctgcgcc	38700
tcgatcggat caccagcgt cgtgcccgtc ccgtgccct ccaccacatc cacatccgcc	38760
acagacaacc ccgcacacgc caacgcctgc cgaatcacc gctgctgcga cggaccatc	38820
ggcgccgtca acccattoga cgcaccgtcc tgattcaccg cactcccccg caccaccgcc	38880
aaaacccgat gaccacgacg ttcagcctcg gacagccgct ccagcagcaa aatccccacg	38940
ccctcgga tgccgggtgc gtcggcagcc gacgcgtacg ccttgacccg gccgtccggc	39000
gacagacccc gctgcgcga gaactccacg aacatgccc ggggtggacat gaccgtcacg	39060

cctccggcga gggcgaagga ggactcaccg gtgcgcagtg actggcaggc gaggtgcagt	39120
gccaccagcg acgacgagca cgccgtgtcg accgtcaccg cggggccctc gaagccgaag	39180
gtgtaggcga cgcgtccgga caggatgctt cccgcgttgc cgttgcccag gtagccggcc	39240
aggctcgtcg ggaccgagag cagacgggtc gcgtagtcct gggacatgag gccggcgaag	39300
acgcccgtcc ggtgcgcgcg caacgtggcg gggtcgatgc ccgcccgtc caacgcctcc	39360
caggacacct ccagcatcaa ccgctgctgc ggatccatcg ccaacgcctc acgcggaactg	39420
atccccaaaa accccgcctc gaactccgcc gcaccctcca ggaaaccgcc ccggcgcgta	39480
tacgacgaac ccgcccgcgc cggctccgga tcatagaaag cctccacgtc ccaaccccgg	39540
tcgaccggaa actccccac cgcctccga cccgacgcaa tcaactcca gaaatcctcc	39600
gccgactcca cccccccgg aaaacggcac gccatcccca caattgcaat cggctcctgc	39660
tcgcccgtt caatctgtg aagtcgacgc cgcacattga ggagatcggc agtaacgcgc	39720
ttgagatagt cgcggagctt ttctcgtta gccatggacc ggtctcctcg acaagagaaa	39780
tcggaaatta aaaaacacgc atgggactct cacaggctag agcgacgaga gcagcacaaa	39840
taccctaga taccacagac ccctgatgct cgatgaatgc cgtatagct aggggggtatg	39900
gcgcagaca tg	39912

<210> 4

<211> 60

<212> DNA

<213> Streptomyces avermitilis

<400> 4

ccatggaccg gtctctcga caagagaaat cggaaattaa aaaacacgca tgggactctc	60
--	----

<210> 5

<211> 3274

<212> DNA

<213> Streptomyces avermitilis

<400> 5

accggtcacc cggattcca ttccgtgttg cagcacgcga cccactgcgc atcccactcg	60
tgaattgtgg accgccatcc ggggcacgga tgtctccagg aaggaactcc ttcaccctcg	120
cgaacaccac ctcagaatcc cagcatcctc agttaatcat caaagtcagc gaccttgaca	180
ctaccccgc caccagggca aattcataac actgaccatc acctctgatg ctgatcaacc	240
cagcccgcac ggccgcgacc gcttttgctc aagcaatcga aatccccgag acacgctttc	300
ttggaaaaag gagaaataag aacatcatgc agggagtctc ctgtctgcac cccctcggga	360

aaccagaaga actcacgctc gtcgaccggg aaacacagtt ccgcgcgctg cgggtggccc 420
ttaccgaatg cggggccggc acggtgaaac tgctcgtcgc cgaggcgga atgggctgtg 480
gaaagagtac gtctctgggc gaggcactgc acaccgcgc cgcctccggc ttccgctcc 540
tgctgtccgc cgggcttccc gcggaccacc ggcaaccctt cggcgtactg cagcaactgc 600
tgaacgaccc cgcctccgag gacaccgccc gcaccgcgtt ccgccccatg ccggtgcaac 660
acgtccgagg cgcctcga cgcctcgcgc ccggcgcccc gctggcgatc ggcacgacg 720
acgtacagga cgggacccg gagtcgctgc actgtctgat gcgcctcacc cgcactccc 780
ccacctcgcg gatcctgctg ctgtgcaccg ccctggcgtg cagtcgggc gccgaccgg 840
tactcgaagc cgagctgatg cgtcagaccg ccttcgaacg catcacgctg gactgcctgt 900
ccctggacgg agtgaccggg ctggtctcgc accgtgcgc cgggcccacg gcgccccgc 960
cggcggacta ctgcctgacc gtcaccgggg gcaaccgctt gctgctgcgc gccctgctcg 1020
aagagcacag cgaggccgac gccccctcgc caccgccccc ggcgaggccc tccgcgctgc 1080
actccccgc caggccgcgc ccgcgcgcgc cggtcgtcgc cggccgcttc taccagtccg 1140
tactggcctg cctgtccgc acggagacgg cgatcaggca gacggccggc gccctcgcgc 1200
tcctcggcgg cgtgcgcgc gccgacctgc tccccaaact gtcggcgcg agtcccgcgt 1260
cggtcacccg ggggtcgtt gcgctggagg cgacggggct gaccacctcc ggccgtttcc 1320
ggcaccgggt ggccgaggcc gccgcgctcg acgactgga cccgagccgc cgtgccacc 1380
tgacccgcgc agcggcggcg ctgcagcacc acgacgggc gcgcgcgcgc gacgtcgcgc 1440
gccaccttct cgcggcccgc catgcggcgc gccctgggc ggtgtccgtg ctgcgtgacg 1500
ccgccgagca gtcgtggcg caggacgacg tggcgtcgc ggtctcctgc ctggaactcg 1560
cctacggggc ctgtgtccgc gaacgggaac gtccggagat caggatcagg ctccgcgcgc 1620
ctttcggggc caccaacatc gcggtggcgc aagagcacct cgcgcacctg gtcgccacct 1680
tgcggaagg agaattgacc ggccatcaga cggctttact cgtccctctg ctctcaacc 1740
acggccgcct cggcgaagcg cgggaggcga tggaccggtt caacgcgcgc gacgacgcgc 1800
gcggcctgtg cgcggacggc ggcttcccga tggcgcctcc gtggcgtcg accgcacacc 1860
tcgcgcacg ccgcgatccc gccgcgcgc gcgatccgc caccgcgcgc gatccgcgc 1920
acaagccgtt cctgccccgc cagtcgggtg cccgcagcc ccggccggag gacggcgtg 1980
gccagcagcc gacagcggcc ttgtgggccc tgcccgaaa cggcaccagc gaggcgccg 2040
cacacgcgc ggaacaggta ctgcggtcct cccgcgtcac cgacagcacc ctctgtctcc 2100
tggtgaacgc cgtgcggatc ctcccccga cgggcggta cgacaccgc gacatctggt 2160
gccaccgctt gctcggcgag gccaccgct gccgttgtcc cggctggcag gcgcacctcc 2220
tggcgggtcg ggccgaactc tcgctgtgcc gtggcctgct cgcgcagcc aaggagtgcg 2280
cccagcgcgc actgacacac gtaccggggc acagccgcag cgtcttcgcg ggcggtccgc 2340
tggcctgcca ggtcctcgc tgcaaccgga tgggacgcta cgacgaagcc acgcaactgc 2400
tcagccatcc ggttcccgc gcgctgttcc acagtgtgta cggcctgggg tacctgcggg 2460
cccggggcca ttccacctg gccatgaacc gcctgcccgc cgcgctccgc gacttctca 2520

ccgccggccg ggtggcgccg gagtggggac tggaccatcc ggtgctgctg ccctggcgta 2580
 cggacgccgc ggaggcggtc ctccggctcg gggaaacgaa gaggggccgac caactcctca 2640
 ccgaacagct cgtctccccg cacagcggca acccgtagct ccgcggcacc gcgctgcgcc 2700
 tgcgggcccc gaccgcggcg ccggcggaac ggctccggct gctgagcgag gcggtcagtg 2760
 acctccagag ctccggcgac cgcctggcgc tggcccgcgc actggccgat ctggcgccg 2820
 cgtatcacag ccggaacgag ccgtagcggg cgagcgccac ggtccgccgc gcctggcagc 2880
 tggccaagga gtgcggagcc caggccctgt gcgacagcat cctgccagt cgcggcacca 2940
 aggaccgggg gcccgacgga agggcgggcg cgaccgaggc cctgctgagc gagtccgaga 3000
 tgcgagtcgc gacactggcg gcggcgggca acaccaaccg tgagatcgcc ggccggctct 3060
 gcgtcacctg cagcacggtc gaacagcatc tgacgcgggt ctaccgcaaa ctgaacatca 3120
 cccgccgcag ggagctgccg acccgctctgc gacacctgcg ggaccaggcc aactgaccac 3180
 gggagggggg gcgtcccggc cgacgtgtgc tcgtcttcg cctcacgaca tggcgggcgc 3240
 gatgcacagc cccccactcg catccaccaa ctga 3274

<210> 6

<211> 11041

<212> DNA

<213> *Streptomyces avermitilis*

<400> 6

ctgcagccgg ccgcacccc caccgcggcc ccccgacgc tcctccaaaa tcacatgcgc 60
 attcgtccca ctaccccga acgcagacac ccccgacgc cgcagccgac cctccacccc 120
 cggccactcc acctcatccg ccaacacacg aaccgaccca ctcgaccaat ccacctgcga 180
 cgacggctca tccacatgca acgtccggcg caacaccccc gcccgcaacg ccatcaccat 240
 cttgatcaca cccgccacac ccgcagcagc ctgcgcatgc ccgatgttcg acttcaccga 300
 ccccaaccac accggcggtg caccggcccg ctgcccgtac gtggcgagca acgcctgcgc 360
 ctcgatcgga tcaccagcg tcgtgcccgt cccgtgcccc tccaccacat ccacatccgc 420
 cacagacaac cccgcacacg ccaacgcctg ccgaatcacc cgctgctgcg acggaccatt 480
 cggcgccgtc aaccattcg acgcaccgtc ctgattcacc gcaactcccc gcaccaccgc 540
 caaaacccga tgaccacgac gttcagcctc ggacagccgc tccagcagca aaatccccac 600
 gccctcggac atgccgggtg cgtcggcagc cgacgcgtac gccttgacc ggccgtccgg 660
 cgacagaccc cgctgccgcg agaactccac gaacatgccc ggggtggaca tgaccgtcac 720
 gcctccggcg agggcgaaag aggactcacc ggtgcgcagt gactggcagg cgagggtcag 780
 tgccaccagc gacgacgagc acgccgtgtc gaccgtcacc gcggggccct cgaagccgaa 840
 ggtgtaggcg acgcgtccgg acaggatgct tcccgcttg ccgttgccca ggtagccggc 900
 caggctcgtc gggaccgaga gcagacgggt cgcgtagtcc tgggacatga ggccggcgaa 960

gacgcccgtc cggtgcccgc gcaacgtggc ggggtcgatg cccgcccgt ccaacgcctc	1020
ccaggacacc tccagcatca accgctgctg cggatccatc gccaacgcct cacgcggact	1080
gatccccgaaa aacccccgat cgaactccgc cgcaccctcc aggaaaccgc cccggcgcgt	1140
atacgacgaa cccgcccgc cgggtcccg atcatagaaa gcctccacgt cccaacccc	1200
gtcgaccgga aactccccca ccgcatcccg acccgacgca atcaactccc agaaatcctc	1260
cgccgactcc acaccccccg gaaaacggca cgccatcccc acaattgcaa tcggtcctg	1320
ctcgccgat tcaatctgct gaagtcgacg ccgcacattg aggagatcgg cagtaacgcg	1380
cttgagatag tcgcggagct tttcctcgtt agccatggac cgggtctcctc gacaagagaa	1440
atcggaatt aaaaaacacg catgggactc tcacaggcta gagcgacgag agcagcacia	1500
atacccctag ataccccaga cccctgatgc togatgaatg ccgctatagc taggggggat	1560
ggcgccagac atgaattcac agcgtttcgg cggccggctg gcgcttgta caggtgcagg	1620
cgggtggcatc gggcgggcga ccgctgcgc tctcgatcg gccggggcgc gagggtgtg	1680
cgtggaccgg gacggccgcg gcgcgggggt gacggccgac ctggcccga cgcggggcgc	1740
gcgggcggcc tggcccgagg tggccgacgt gtccgacgga gcggcgatgg agcggttcgc	1800
cgagcgcgtc gccgagacgt acgggggtcgt ggacctgctg gtgaacaacg ccggcatcgg	1860
catggcgggg cgttttctcg acacgtccgt cgaggactgg cagcgcaccc tgggcgtcaa	1920
cctctgggggt gtcattcatg gttgcgcct catcgccgg cagatggcgg agcgcgggca	1980
ggcggggcac atcgtgacgg tggcgtcggc ggcggcggtc cagccgacgc gggcggtccc	2040
cgcgtatgcc accagcaagg cggcggtgct gatgctgagc gaggcctgc gcgcggagt	2100
cgcggagttc ggggtcggag tgagcgtggt gtcccgggc ttcgtccgta cgtcgttcgc	2160
gtcggcgatg catttcgcgc gtgtgccccg gctggagcag gagcggctgc gggcgctgtt	2220
cgcgggtcgc ggatgcagcg cggagaagggt ggcccgggcg gtactgcggt cgggtggcgcg	2280
cgactcggcc gtggtgaccg tgacggcgga agcgcggctg tcacggctga tgagccgctt	2340
cacgccacgc ctgcgcgcgc cgggtggcgc gatggatccc ccttcgtagg gctggcgggg	2400
atccccctct tgccttcgaa catcttcga cgatgggcag tgagagatgt cagatcattt	2460
tctcttcgat agtgccgcgt tctgggggca tgtgttcccc agtctcgcgc tggcggagga	2520
gctcgtgcac cggggccacc acgtcacctt tgtgacgggc gcggaaatgg ccgatgcggt	2580
gcgttcctg ggcgtgatt tcctgcggta cgagtccgcc ttcgagggtg tcgacatgta	2640
ccggctgatg accgaggccg agccgaacgc catccccatg acgctgtacg acgagggcat	2700
gtccatgttg cgttcggtgg aggagcacgt cggcaaggac gttccggacc tgggtggcta	2760
cgacatcgcc acctccctca acgtgggtcg tgtcctcgcc gcctcctgga gcaggccggc	2820
catgacggtc attcccctgt tcgcgtccaa cgggcgcttc tccacgatgc agtcggtatt	2880
ggatccggat tccgtcagg tcagtgcgc gccgcgcgc ttctcggagc agatggagtt	2940
gttcggcctc ggggcgctgg tgcgcgcct cgcggagctg ctcgtttccc ggggtatcac	3000
ggaaccggtc gacgatttcc tttccggacc ggaggacttc aacctggtgt gtctgcgcg	3060
cgcttccag tacgcgggcg acaccttcga cgagcgggtc gccttcgctg gaccatgtct	3120

gggtaagcgc aggggtctgg gcgagtggac accaccgggc agcggggcatc cagtgggtgct	3180
catctccctc gggaccgtgt tcaaccggca gctgtccttc ttccgcacgt tcgtccgggc	3240
gttcaccgac gtccccgtgc acgtcgtgat ctgcgtcggc aaggggggtcg accccgatgt	3300
gctgcggccg ctgccgccga atgtcgaggt gcaccgggtg gtgcgcacc atgcgggtgct	3360
ggagcatgcc agggctctgg tcacgcacgg cggtagccggc agtgtgatgg aggcactgca	3420
cgcagggtgc cgggtgctcg tcattgccctt gtcgcggggac gcgcagggtga ccggccggcg	3480
gatcgccgag ctgggggtgg gtcgtatggg gcagccggag gaggtcacgg cgacgacgct	3540
gcgcgggcac gtgctggaca tcattctcga tgacgcgac acccgacagg tcaggcagat	3600
gcagcggggc accgtcgagg cgggcgggcg cctgcgggca gcggacgaga ccgagcgggtt	3660
tctgcgccgg acgcgccgtc actgaccggc agctcggggc gggcgggtgag tggctccac	3720
agggttcggg tctccacgta ccaactgaac gtctgtgcca gccctcctc gaagggcacg	3780
cggggcgcggt aaccgagctc ggccggagatc ttgtgatgt ccagcgagta gcgccggctg	3840
tgcccttgc ggtcgggtcac gggttcgacc atcgaccagt ccacgccgag cagggtccagg	3900
agccggggcg tgagctcacg gttggacagc tccgtcccgc ctccgatgtg gtagatctcg	3960
ccgggcctgc cgcgttcggc gaccagggcg atgccacggc agtgggtcgtc cacgtgcagc	4020
cagtgcgga cgttttcgcc gtcgccgtac aagggcacct tcgtgccgtt cagcagatgg	4080
gtgacgaacc gcgggatgag tttctccggg aactggtggg ggccgtagtt gttcgagcat	4140
cgggtgatga tcaactgtag gccgtgcgtg cgggtgaagg accgggcgag cagggtcggag	4200
gacgccttgg acgcggagta gggcgagttc gggtccagcg gggcgctcctc ggtccacgag	4260
ccggagtcga tggagccgta gacctcgtcc gtcgagatgt acacgaagcg gtccacggcg	4320
gcgtcgggtg cggcgcgag cagggtgtga gtgcgagga cattggtgag tacgaactcg	4380
gcggcgctcg ccacggaccg gtccacgtgt gactccgccg cgaagtggac caccatgtcg	4440
gagccgtcca tcagggtccg gaccaagggc ccgtcgcaga tgtcgccgtg cacgaagatc	4500
agggatgggc ttcccaggac cgggtgcgag ttctccaggc gaccgcgta ggtcagcttg	4560
tcgagcacca cgacctcggc accggtgaac gccggatacg cggccgtcag caaccgccgt	4620
acgaaatggg aaccgatgaa accggcgccg cccgtcacga gtaggcgcat cccgggctcc	4680
tcaccgcggc ttccgcccga atactcatca gatactcgcc gtagccggag ccggccagtt	4740
cgaccccgcg cagatagcag tcgtccgcgt cgatcagacc catccggaag gcgatctcct	4800
cgagacaggc gatccgtact ccctggcgct tctccaggac ctgcacatac tgcccgcggt	4860
gcatacgcga gtcgtgcgtc cccgcacga gccagggtgaa gcccgggccc aggtccacca	4920
gccggggccc cccctcggcg aggtaggccc tgttgacgtc ggtgatctcc agctcgccgc	4980
gggcccacga gcggatgccc cgggcccact cgatcacgtc gttgtcgtac aggtacaggc	5040
ctgtgatcgc cagggtggac cggggggcgg tgggtttctc ctgcacggac agcagctttc	5100
cggaggcgctc gacctctccg actccgtacc gttcgggac cgtaaccgcg tatccgaaca	5160
acacacagcc gtcgacatcg cgggtgtggc tgccgagcag gtgcgaaaag cccatgccat	5220
ggaagatgtt gtccccaagg acaagggaca cctgatcctg accgatgaaa tcggcgccga	5280

tgaggaatgc ctcggcgatt cctcccggtc gctgctgcgc ggcgtagtcg atgttcagcc	5340
cgaggcggtt tccgtctccg agcagtctcc ggaattgttc gagatgatcg ggtgaggaaa	5400
tcaccaggat gtcttttatg ccgccgagca tcaacacgga gagcgggtag tagatcatgg	5460
gtttgtcgta gacagggagc agctgcttgg aaagggcacg ggtcaacggg taaagccgag	5520
agccggttcc ccccgcgagc acgattccct tcatgtcggc ctccccgcag tcgacgttat	5580
atatctctgc cgtctgcccc acggtaccaa gtggcggaac acgcaccagg aattcgagcg	5640
ccgctagggg gaagggctca agaagatagg ggccaccaga tggggcggtt ttcgggtgtgc	5700
ccgccccggc cgaccggaat actgaagagc atgctgacga ctgggatgtg cgaccgaccg	5760
ctggctcgcg tactcggagc ctccggctat atcgggtcgg ccgtcggggc ggaactcgcc	5820
cggtggccgg tcctgttgcg gctgggtggc cggcgaccgg gcgtcggttc gccggggggc	5880
gcccgggaga ccgagacggc tacggccgac ctgacggcgg cgagcgaggt cgcctcgcc	5940
gtgacggagc ccgacgtggt gatccacctg gtgcgcgcgc tcaccacagg agcggcatgg	6000
cgggcgggcg agagcgatcc ggtggccgag cgggtgaacg tcgggggtgat gcacgacgtc	6060
gtcgcggccc tgcggtccgg gcgcgcgcgc ggcccgcccc cggtgggtgtt gttcgccggg	6120
tcgggtctacc aggtggggccg ccgggggtcgg gtgcgacggc gtgagccgga cgagcccggtg	6180
acggcctatg cccgtcagaa actcgacgcc gaacggacgt tgaagtcgcg cacggtcgag	6240
ggtgtcctgc gggggatctc gctgcggctg cccaccgtct acggcgcggg gccggggccc	6300
cagggcaacg gcgtcgtgca ggcgatggtg ctccggggcg tcgccgacga ggccctcacc	6360
gtgtggaacg gaagcgtggt ggagcgtgac ctggtgcatg tggaggatgt cgcgcaggcc	6420
ttcgtgagct gcctggcgca cgcggatgcg ctccgggggc ggactgggt gctcggcagc	6480
ggtcgtcctg tgaccgtccc gcaactcttc ggtgccatcg ccgccggcgt gtccgcccgc	6540
accggcgccc ccgcggtgcc cgtgaccgcg gtggaccctc cggcgatggc gacggcgggc	6600
gacttccacg ggaccgtcgt cgactcctcg gcgttcggcg cggtcaccgg gtggcgggcg	6660
cggtgtcgc ttcaggaggg cctggaccac atggtggcgg cttacgtgta gcgccggggt	6720
ggcgccgggg cccggggcgg gacggcccg atccgggtcg gccgtcacag cttctcgtcg	6780
aggccgcggc tcgcgcggta ctccggcaac atgccgcgtc gcagggcctg ctggagagtc	6840
ggcgcgcgcc ggtcgcgctc ggagaggatc ggtgcccgcc cgaggtggtg gccgaggggc	6900
agggcgaggt ccggatcctc gggcgagagg gcgtgttcgt tctgcggaac gtagccgctc	6960
gacatcaggt acaccatcgc cgtgtcgtct tccagcgcca cgaacgcgtg cccgaccccc	7020
atcggcaggt agacggaacg gaagcgctcc tggtcgagga ggaccgagtc cactgcccg	7080
aaagtcggtg agccggtgcg caggtcgacg acgaagtcca gggcccgctc ccggggcgag	7140
tggacgtact tggcctggcc ggggtggtgc gcggtgaagt gcacgccgcg gacgacgccg	7200
cggcgcgaga cgctctggca ggtctgcgcg gtgggaaacc ggtgcccgac ggccctcgctg	7260
aggaccggtt cctggtaggg ggtgacgaag agcccgcgct cgtcggggaa gaccgtcggg	7320
gtgaattcga cggcgccctc gacgacgagc ctccggaccg tgacaccggc ggcggtggcc	7380
cgggcgcccc cggcgggggc gggccggtcg gcggagctcc ggcgaggccg gccaaagggtc	7440

atcgtctgcac tctctctgtc gtgcggttg tcatacgggt agtcgtacgg gccggttccg	7500
gagtcacagc tcgacggcgc ggggtggtgag cagggacagc aggggtcggg cctgcacgtt	7560
cacgtaacgg cegtaccgca gcagctgggt cagctggccc ggggtgcacc agcggtaacc	7620
cggggcgggg tcgttcggcg cctggctctc gtcggcctcg acgaacaggt agcgcgcctg	7680
tgctgcaga aagcgaccgc cctcctccga gtggaccgcc gcgtagcggg tgcggtcggg	7740
cgcgccctcc agcaccaggt cgaggaagcg cggcctggcc ggtcccgtga ggtgggcgta	7800
gttgcgcggg gtgtactgga ccgtcgggcc gattcgatc gtgtcgagga agccgccctc	7860
gacctgccc tgggcgagca ggtgcggtac gccgcgatc cgccgggtca ggaaggcggt	7920
gatgccgtgg ccgcacggtt cgatcagggg ctgggtccag gcggcgacct cccggttggg	7980
ggcctcgaca cggaccgcga ccacacggaa gtaccgggtc gcgtgggtgg cgatggactc	8040
cgcgcccgtg gtccagccgg ggtgccggc caggggcacg cggcgggcgt gcacggagt	8100
ccgggagcgt tcggcgggcgt accaggagag cagttcgggc tcgctgtgca gggccgcggg	8160
ctcgtcgaac ggggtgggaa ggcaggcgag gacctgctg gcgtccatgt tcaccaggtt	8220
gtcccgggtc atcagttcgc cgatctgccc cagtgtcagc cagcggaaagt cgtcgtccag	8280
tggtacgtcc tcgtcgggtt ccaccaagat gttgcggtt aacttccggt ggaaccaggc	8340
tccgtgctcg gactggagga cgtcgaccac caggtggcg cgccggggct gtgtgaagta	8400
ctcgaggtac ttacaggcgg cgccccgtg gaccttgggt tagttgctgc gcgtggcctg	8460
cacggtgggc gacagctgga ccaggtgat gttgccggc tccatcttgg cctgcacag	8520
gaagtgcagg accccgtcga acttcttggc gaggatgccg aggatgccga tctcgggctg	8580
gtggatgatg ggctgtgcc attccgggaa gggctgttca ccgcctcgga cgtgcagtcc	8640
ctccacggag aagaaccggc cgctgcggtg ggcagattg ccggttccgg ggtgaaacga	8700
ccaggcgtcc atcccgtgga aggggatgcg ctcgaccggc aaccgggtgg ccccggaaccg	8760
ccgcgtccac cagccggtga acgcgtcgag ggacgtccgg cgccggtgtc gccacggcg	8820
gcggagcggg cgaggcacgc gggcagggcg gcgtcgtgcc gcgcggtgag cgggtgctggg	8880
ctcgggtgtg tcggcatcgg ctcgtacgt catgcacccc acgtcatgta gatcacgggt	8940
ggctcgcggc cgggcagttg gcgcagtggt gcgtggctga ggccgaacgc ctcgtcagc	9000
gccttgggtt cccccggcca ttgggggtg gtgagttcgt cgaaggcgag gatgtgccc	9060
ctggtcaggt gcggtgtgat gacgtccagc agttcgcgcg tggggcggtg gaggtccagg	9120
tcgaagtagg ccagcgcgat gacggtgtgc ggggtgttccg ccaggtattg gggcacggtt	9180
tcgcgtacgt cgccctggac cacgaaggaa cgctgggtgt ggccgtaggg ttcgttcgcc	9240
tcgtgcggc cgagcacctg ccgcaggtgc tccacttcgc cgtccggcac ggcaaccgc	9300
ccagggaccg cgctggtgct gacctcgtcc gcctcgtcga tgtcggggaa gccggtgaac	9360
gtgtcgaagc cgatgacgcg gcgcagcgag ttgtacggct catagatgct gcgcagcgcg	9420
gtcagcgtgg cgaggtgccg tccgtgcaga acgccgaact ccatgatgac gccggggact	9480
tccggcagca tgcggtacag cgcgtccatg gagagcaggt cggcgagctg gttgcgcgc	9540
atgtagacgg acaggttgtc gatcaggtac ttcggcgggg tcgggctgtc gacgaggagc	9600

ttggtcagct gctcgcgggc agcgcgttcc tgctcggact cgtgcggcac gatccgggga	9660
tcggtgaact cccgctcggg catggaggcc ttctctttca tgggtcggta ccgggcgcgc	9720
cggacgtgcc ggtcgtaccg ggcgtgccgg cgggcacgac gctgtcgggt caggacagcc	9780
aggcgtcggg ggcggatccg ccgcgccga ccggggggaa cagctcctcc aggcgggcca	9840
ggacgggctc gggcagcggg gtgcgcaggg cgtgcagtgc cccgtccacg tgctgttcgg	9900
tgcgcgccc gatgaccagc ccggtcacgc cgggcccga cagcaccag gccatgccga	9960
catgggcggg gtcgaggccg tgggtccgc acacgtcctc gtacgccgcg atggtggtgc	10020
ggtggtgctc cagggcctcg acggcccggc cctgtgccga cttgaccgcg gtgttctccc	10080
gcgtcttgcg caggacaccg ccgagcaggc cggcgtgcag tggcgaccag accaggacgc	10140
cgacaccgta ggcggacgcg gcggggatga ctccagctc ggcggtcgg gtcacgaggt	10200
tgtagacgca ctgctcggag gcgaggccca gggcgttcg ccgccggg ccctcctggg	10260
cgggaagcgt gtcccagccc gcgaagtgg aggagccgac gtacgcacc ttgccctgcg	10320
tgatgagcag gtccatcgcc tgccacacct cgtccagcc ggcgcggcg tcgatgtggt	10380
gcagctggtc caggtcgatc cagtcggtgc gcagtcggcg cagcgaggcg tcgcaggcg	10440
ccacgatatt gcgtacggac agtccgtgat cgttggggcc gctgcccac ggatcgccga	10500
ccttggtggc cagcaccacc tgctcacgc gggcgggcg gtccgccagc cacctgccga	10560
tgacctcttc ggtgtacccc ttgtggacgc gccagccgta ggtgttgcg gtgtcgaaca	10620
gggtgatgcc ctgagccagg gcgtgatcca tcagtcggcg cgttcgggc tcctccacc	10680
gtccgcgat gttgaccgtt ccgagcgcca gtcggctgat cctcagccgg gtcctgccca	10740
gttcggtgtg gaggggagca ctgctgttc tgctcgactg gacgggtgcg ggctcggcg	10800
tcgtaggcat catcgatcag tcgacactcc ctcgtcgtg agcgcgggc gctcgagcag	10860
gaccctgacc tgaggcccag gaggtaccg gcgatcatgc gatacaggca gccgctcgat	10920
ggtgggacac gggctgccgt cggcgggcat aggggctgat gggggtgtc cgggtcgggt	10980
ccggtgaca gcttcgtgga caccaagttg atccagttga tccactccga aaggcagagg	11040
c	11041

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/07407

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/09, 1/21, C12P17/18// (C12N1/21, C12R1:465)
(C12P17/18, C12R1:465)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/00-15/90, 1/21, C12P17/00-17/18

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
MEDLINE (STN), BIOSIS/WPI (DIALOG), CA/REGISTRY (STN), JSTPlus (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> A	WO 93/18779 A1 (MERCK & CO., INC.), 30 September, 1993 (30.09.93), & US 5312753 A & EP 637244 A1	<u>1, 3</u> 2, 4-15
<u>X</u> Y	NAKAGAWA, K. et al., MICROBIAL CONVERSION OF MILBEMYCINS: HYDROXYLATION OF MILBEMYCIN A ₄ AND RELATED COMPOUNDS BY Cunninghamella echinulata ATCC 9244. J.Antibiot., 1991, Vol.44, No.2, pages 232 to 240	<u>1, 3</u> 1-15
Y	CARTER G.T. et al., LL-F28249 ANTIBIOTIC COMPLEX: A NEW FAMILY OF ANTIPARASITIC MACROCYCLIC LACTONES. ISOLATION, CHARACTERIZATION AND STRUCTURES OF LL-F28249 α , β , γ , λ . J.Antibiot., 1988, vol.41, No.4, pages 519 to 529	1-15

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
04 July, 2003 (04.07.03)

Date of mailing of the international search report
22 July, 2003 (22.07.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/07407

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Haruo IKEDA et al., "Combinatorial Biosynthesis -Polyketide K gobutsu o Rei to shite-", Protein, Nucleic acid and Enzyme, Vol.43, No.9, (1998), pages 1265 to 1277	1-15
Y	Haruo IKEDA et al., "Metabolic Engineering no Tenkai-1 Biseibutsu 2ji Taisha Sanbutsu Seigosei no Kinoteki Kakuhen ni yoru Yuyo Bushitsu no Sangyo", Kagaku to Seibutsu, Vol.34, No.11, (1996), pages 761 to 771	1-15
Y	Haruo IKEDA et al., "Series Taisha Kogaku/Seigosei Kogaku (4) Seigosei (2) Hosenkin Polyketude Segosei Idenshi no Kaiseki to sono Oyo", Bioscience & industry, Vol.59, No.8, (2001), pages 530 to 533	1-15
Y	JP 2003-33188 A (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.), 04 February, 2003 (04.02.03), (Family: none)	1-15
Y	MACNEIL D.J. et al., A Comparison of the Genes Encoding the Polyketide Synthases for Avermectin, Erythromycin, and Nemadectin. Ind.Microorg.(Edited by BALTZ R.H. et al.), 1993, pages 245 to 256	1-15
A	SHIH T.L. et al., SYNTHESIS OF AN AVERMECTIN-NEMADECTIN HYBRID. Tetrahedron Lett., 1991, Vo.32, No.30, pages 3663 to 3666	1-15

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C12N 15/09, 1/21, C12P 17/18 //(C12N 1/21, C12R 1:465) (C12P 17/18, C12R 1:465)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C12N 15/00-15/90, 1/21, C12P 17/00-17/18

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE (STN), BIOSIS/WPI (DIALOG), CA/REGISTRY (STN), JSTPlus (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>X</u> A	WO 93/18779 A1 (MERCK & CO., INC.) 1993.09.30 & US 5312753 A & EP 637244 A1	<u>1,3</u> 2,4-15
<u>X</u> Y	NAKAGAWA K. et al. MICROBIAL CONVERSION OF MILBEMYCINS: HYDROXYLATION OF MILBEMYCIN A ₄ AND RELATED COMPOUNDS BY <i>Cunninghamella</i> <i>echinulata</i> ATCC 9244. J. Antibiot. 1991, Vol. 44, No. 2, p. 232-240	<u>1,3</u> 1-15

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

04.07.03

国際調査報告の発送日 22.07.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JJP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

三原 健治



4N

2937

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	CARTER G.T. et al. LL-F28249 ANTIBIOTIC COMPLEX: A NEW FAMILY OF ANTIPARASITIC MACROCYCLIC LACTONES. ISOLATION, CHARACTERIZATION AND STRUCTURES OF LL-F28249 α , β , γ , λ . J. Antibiot. 1988, Vol. 41, No. 4, p. 519-529	1-15
Y	池田 治生 他, コンビナトリアル・バイオシンセシス ーポリケチド化合物を例としてー 蛋白質 核酸 酵素, Vol. 43, No. 9(1998)p. 1265-1277	1-15
Y	池田 治生 他, メタボリックエンジニアリングの展開-1 微生物 2 次代謝産物生合成の機能的改変による有用物質の生産 化学と生物, Vol. 34, No. 11(1996)p. 761-771	1-15
Y	池田 治生 他, シリーズ 代謝工学/生合成工学④ 生合成② 放線菌ポリケチド生合成遺伝子の解析とその応用 バイオサイエンスとインダストリー, Vol. 59, No. 8(2001)p. 530-533	1-15
Y	JP 2003-33188 A (協和醗酵工業株式会社) 2003. 02. 04 (ファミリーなし)	1-15
Y	MACNEIL D. J. et al. A. Comparison of the Genes Encoding the Polyketide Synthases for Avermectin, Erythromycin, and Nemadectin. Ind. Microorg. (Edited by BALTZ R. H. et al.) 1993, p. 245-256	1-15
A	SHIH T.L. et al. SYNTHESIS OF AN AVERMECTIN-NEMADECTIN HYBRID. Tetrahedron Lett. 1991, Vol. 32, No. 30, p. 3663-3666	1-15